



UNIVERSITÀ DI PISA

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA  
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOLOGIA MOLECOLARE E  
CELLULARE**

**Tesi di Laurea Magistrale**

**Impatto dell'attività chinasica su dinamica di  
membrana e funzionalità del recettore  
neurotrofinico TrkA**

**Relatore:**

**Prof. Stefano Luin**

**Candidato:**

**Rosy Amodeo**

**Correlatori:**

**Prof. Mario Pellegrino**

**Prof.ssa Garcia Gil Maria de las Mercedes**

# INDICE

## RIASSUNTO

1.INTRODUZIONE .....	6
1.1. Le neurotrofine e i loro recettori .....	6
1.2. Il recettore TrkA .....	10
1.3. Mutazioni a carico del recettore.....	20
1.4. Tecniche di microscopia avanzata per l'analisi di cellule vive.....	25
1.4.1. Analisi a <i>single particle tracking</i> .....	28
1.5. Studi di <i>imaging</i> a singola molecola del recettore TrkA: stato dell'arte .....	36
2.SCOPO .....	42
3.MATERIALI E METODI .....	43
3.1. Generazione dei mutanti di ACP-TrkA.....	43
3.1.1. Disegno dei primers .....	43
3.1.2. Mutagenesi.....	45
3.1.3. Quantificazione del DNA .....	50
3.2. Mantenimento della linea cellulare.....	50
3.3. Trasfezione .....	51
3.4. Preparazione dei lisati proteici.....	52
3.5. Saggio di Bradford .....	53
3.6. Western Blot.....	55
3.8. Reazione di <i>labelling</i> del recettore TrkA sulla membrana di cellule vive .....	59
3.9. Acquisizione dei campioni marcati mediante microscopia .....	62
3.9.1. Acquisizione di campioni mediante microscopia confocale .....	62

3.9.2. Acquisizione di campioni mediante microscopia TIRF .....	62
3.10. Utilizzo di software di analisi.....	63
3.10.1. Costruzione delle traiettorie .....	63
3.10.2. Analisi delle traiettorie .....	64
4.RISULTATI.....	66
4.1. Creazione di mutanti puntiformi e combinati della sequenza di ACP-TrkA .....	66
4.2. Validazione biochimica dei costrutti generati .....	71
4.3. Verifica della localizzazione recettoriale a livello di membrana .....	73
4.4. Analisi a singola molecola dei costrutti .....	76
4.5. Analisi delle traiettorie .....	78
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI .....	82
ACRONIMI .....	84
BIBLIOGRAFIA .....	87

# Riassunto

Questo lavoro di tesi si inserisce in una linea di ricerca che si propone di studiare la dinamica a singola molecola di recettori di membrana responsivi a fattori di crescita neuronale (neurotrofine, NT), ed a correlarla alla loro attività di trasduzione del segnale. Lo studio condotto precedentemente è relativo al recettore ad attività tirosin-chinasica TrkA, caratterizzato da un'alta affinità di legame per il capostipite delle NT, l'NGF. A questo recettore è stata geneticamente fusa la sequenza del tag *acyl carrier protein* (ACP), tecnologia sfruttata per ottenere la marcatura del recettore situato sulla superficie di cellule vive. Studi basati sul tracciamento di singole particelle (SPT-*single particle tracking*) in membrana hanno evidenziato che il recettore TrkA *wild type* (*wt*), in assenza di ligando, mostra un moto di tipo per lo più diffusivo caratterizzato da un coefficiente di diffusività di circa  $0.7\mu\text{m}^2/\text{s}$ ; in presenza del ligando NGF la dinamica invece rallenta, aumenta il numero di traiettorie confinate e il numero di forme dimeriche e oligomeriche del recettore, che verosimilmente sono implicate nelle piattaforme di *signalling* e di internalizzazione del recettore attivato. Nel contesto di esperimenti miranti a comprendere il collegamento fra il tipo di moto in membrana e le diverse risposte biologiche, è stato costruito un mutante privo di attività chinasica (*dead-kinase*), ottenuto attraverso la mutazione K547N, la quale va a bloccare il sito di legame per l'ATP a livello del dominio chinasico. Tale mutante non è in grado di indurre i processi di autofosforilazione del recettore stesso e di attivazione di effettori intracellulari in risposta al ligando NGF. Nell'ambito degli studi sulla mobilità il suo andamento è risultato essere rallentato indipendentemente dalla presenza di NGF, un comportamento paradossalmente simile a quello riportato per il recettore *wt* attivato da NGF.

Il lavoro di tesi parte da questa osservazione, con lo scopo di comprendere la causa del comportamento dinamico del mutante *dead-kinase*; la nostra ipotesi è che esso venga bloccato in precursori di vescicole di internalizzazione per la degradazione, ma non è nota quale sia la funzionalità compromessa che porta a questa condizione. Abbiamo scelto di indurre mutazioni puntiformi a livello di singole tirosine del dominio citoplasmatico del recettore con l'obiettivo di indagare se e quali residui mutati siano responsabili del comportamento dinamico del mutante *dead-kinase*. Sulla base della letteratura disponibile, le tirosine che sono state scelte per la mutagenesi sono le seguenti: Y499, Y679, Y683, Y704, Y684, Y760, Y794 (numerazione riferita al cDNA di

ratto) e la mutazione su di esse indotta è stata una conversione a fenilalanina, che impedisce la fosforilazione del residuo pur mantenendone la struttura aromatica, senza quindi alterare significativamente la struttura della proteina. A partire dal costrutto ACP-TrkA *wt*, sono stati prodotti sia mutanti singoli per ciascuno dei suddetti residui che mutanti combinati, in cui i residui sono stati raggruppati in base alla specifica funzione che li vede coinvolti; nel dettaglio, verranno discussi i risultati sul *Kinase-Mutant*, mutante combinato dei residui Y679F-Y683F-Y684F, responsabili dell'attività chinastica e il *Recruitment-Mutant*, mutante combinato dei residui Y499F-Y760F-Y794F, responsabili del reclutamento di effettori intracellulari. Tali mutanti, insieme al costrutto *wt* e al *dead-kinase*, sono stati quindi trasfettati nella linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y. La validazione biochimica dei costrutti è stata effettuata usando due approcci sperimentali: i) saggi biochimici di Western Blot; ii) localizzazione dei quattro costrutti espressi e marcati in membrana attraverso acquisizioni in microscopia confocale. Questi ulteriori esperimenti sono stati finalizzati a capire se i quattro costrutti vengono espressi correttamente dalle cellule o vanno piuttosto incontro a processi degradativi e se i loro livelli di espressione sulla membrana plasmatica, almeno in condizioni di assenza di NGF, sono paragonabili.

La presenza dell'ACP-tag ha permesso la biotinilazione selettiva dei recettori espressi sulla membrana delle cellule e la loro successiva marcatura con dei fluorofori molto brillanti (Quantum-dot) coniugati a streptavidina. È stato quindi possibile effettuare misure di SPT dei quattro costrutti marcati sulla membrana plasmatica di cellule vive, mediante microscopia TIRF. I filmati così ottenuti sono stati analizzati con un programma di *tracking* per la generazione delle traiettorie dei recettori, che poi ho processato utilizzando algoritmi di analisi già disponibili in laboratorio. I risultati ottenuti indicano un comportamento diffusivo del *Kinase-Mutant* simile a quello del *dead-kinase* mentre il *Recruitment-Mutant* ha un comportamento paragonabile a quello del TrkA *wt*. Ciò suggerisce che, verosimilmente, le tirosine coinvolte nel comportamento anomalo del mutante *dead-kinase* siano quelle responsabili dell'attività chinastica del recettore.

# 1. Introduzione

## 1.1. La famiglia delle neurotrofine e i loro recettori.

Le Neurotrofine (NT) costituiscono una famiglia di fattori di crescita neuronali coinvolti in modo cruciale nella regolazione di diversi processi biologici a livello del sistema nervoso centrale e periferico (rispettivamente SNC e SNP), quali sopravvivenza cellulare, differenziamento, crescita neuritica, mantenimento della cellula, rigenerazione neuritica e plasticità neuronale. Nei mammiferi esistono quattro diversi membri di NT:

- **NGF** (*Nerve Growth Factor*)
- **BDNF** (*Brain Derived Neurotrophic Factor*)
- **NT-3** (*Neurotrophin3*)
- **NT 4/5** (*Neurotrophin-4/5*)

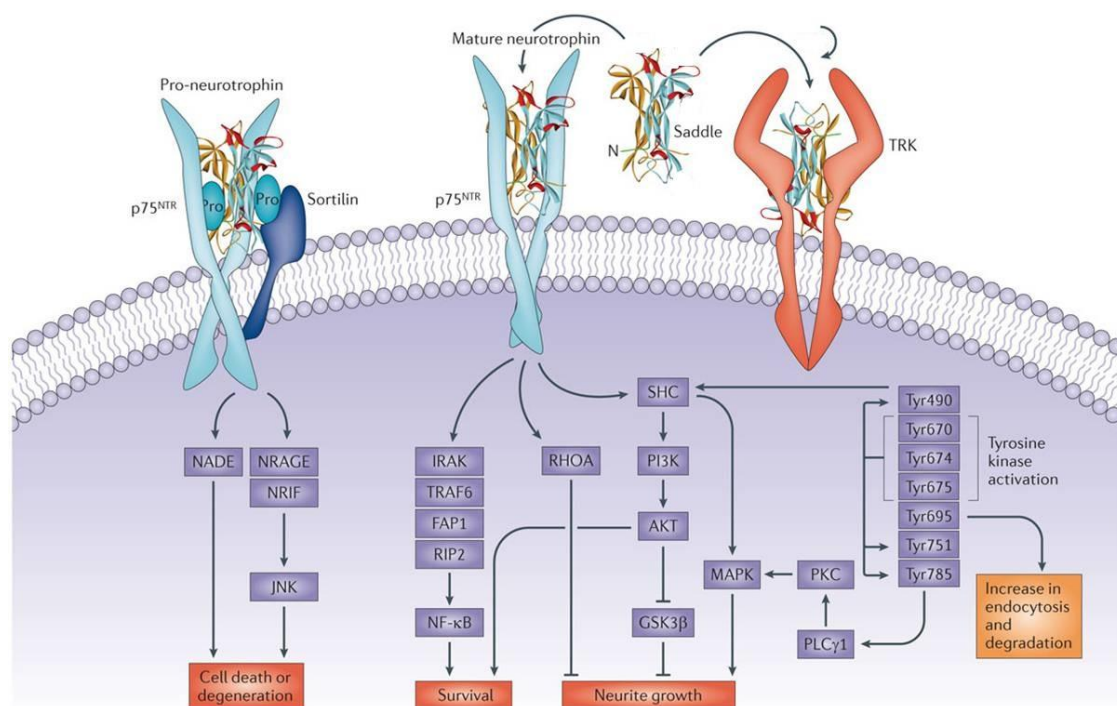
Le NT sono sintetizzate sottoforma di lunghi precursori (pre-proNT), i quali contengono un peptide segnale necessario per la secrezione delle proteine (pre-peptide) della dimensione di circa 2 KDa. Quest'ultimo, una volta traslocato nel reticolo endoplasmatico, viene tagliato rilasciando a sua volta un precursore della proteina (proNT) della dimensione di 30 KDa che si associa rapidamente come omodimero non covalente. La sequenza del proNT viene tagliata in corrispondenza di un sito aminoacidico altamente conservato a livello del trans-Golgi ad opera delle proteasi furina e pro-convertasi oppure, una volta secreto, a livello dello spazio extracellulare per il taglio ad opera della plasmina e di altre metallo-proteasi. Tale taglio produce la proteina omodimerica matura del peso di circa 26 KDa (13 KDa per ciascun monomero) (Chao M.V. et al., 2003; Reichardt L.F. et al., 2006; Marchetti L. et al., 2015).

Le NT agiscono come proteine secrete, espletando la loro funzione attraverso riconoscimento, legame e attivazione di specifici recettori di membrana posti sulle cellule bersaglio generando una cascata di segnali intracellulari responsabili delle loro

pleiotropiche azioni fisiopatologiche (Klein et al.; 1991; Bothwell M. et al., 1995; Reichardt L.F. et al., 2006; Marchetti et al, 2015). Durante lo sviluppo del sistema nervoso le NT sono caratterizzate da una triplice azione:

- azione trofica: le NT sono fattori trofici che vengono prodotti da neuroni o da loro organi bersaglio e sono ritenute necessarie per la crescita delle cellule nervose immature; il rilascio di questi fattori trofici innesca una sorta di meccanismo per cui le cellule che recepiscono la neurotrofina crescono e sopravvivono, tutte le altre invece vanno incontro al fenomeno di apoptosi;
- azione tropica: le NT dirigono l'allungamento delle cellule nervose nella direzione della cellula bersaglio che produce una maggiore concentrazione di neurotrofina stessa (Yamada K.M. et al., 1971);
- azione differenziativa: la cascata del segnale attivata dalle NT converge alla fine, con meccanismi ancora non ben identificati, all'attivazione dell'espressione di geni che portano al differenziamento terminale della cellula neuronale (Greene L.A. et al., 1980).

Gli specifici recettori di membrana situati sulle cellule bersaglio delle NT appartengono principalmente a tre famiglie: i) la famiglia dei recettori ad attività tirosin chinasi *Tropomyosin related kinase (Trk)*; ii) il recettore *P75 Neurotrophic Receptor (P75NTR)*; iii) il recettore *Sortilina*. Tali recettori sono schematicamente rappresentati in Figura 1.1.



Nature Reviews | Drug Discovery

**Figura 1.1. Schema delle tre classi di recettori neurotrofinici e relativa via di segnalazione intracellulare attivata in seguito al legame con le (pro)NT.** Sulla sinistra viene illustrato il recettore P75NTR, che lega le proNT in associazione a Sortilina e la relativa cascata di segnale attivata. Nel mezzo sempre P75 che lega la NT e le relative vie di segnalazione. Sulla destra il recettore Trk che lega la NT matura e le relative vie di segnalazione indotta; i residui di tirosina (Tyr) indicati si riferiscono alla numerazione dei residui di TrkA della specie *H.Sapiens* (immagine tratta da Longo F.M. et al., 2013).

Svariati studi condotti negli ultimi 20 anni hanno dimostrato come queste tre famiglie di recettori neurotrofinici vadano a regolare l'equilibrio tra sopravvivenza e morte cellulare utilizzando una complessa rete di interazioni molecolari, che ancora non sono state del tutto comprese. Ciò che è chiaro è che l'interazione tra il P75NTR e i Trk, in seguito a legame e attivazione da parte di NT mature, è responsabile di una via di segnalazione principalmente trofica, che garantisce la sopravvivenza neuronale. Al contrario la formazione di un complesso tra P75NTR e Sortilina, principalmente mediato da proNT, attiva vie di segnalazione molecolari coinvolte nell'apoptosi (Sofroniew M.V. et al., 2001; Nykjaer A. et al., 2004; Freund-Michel V. et al., 2005). La propensione verso la sopravvivenza o la morte cellulare sembrerebbe essere regolata sia dai livelli di entrambi i recettori in membrana, sia dalla concentrazione delle rispettive NT (nella loro forma immatura e matura) a livello dello spazio extracellulare.



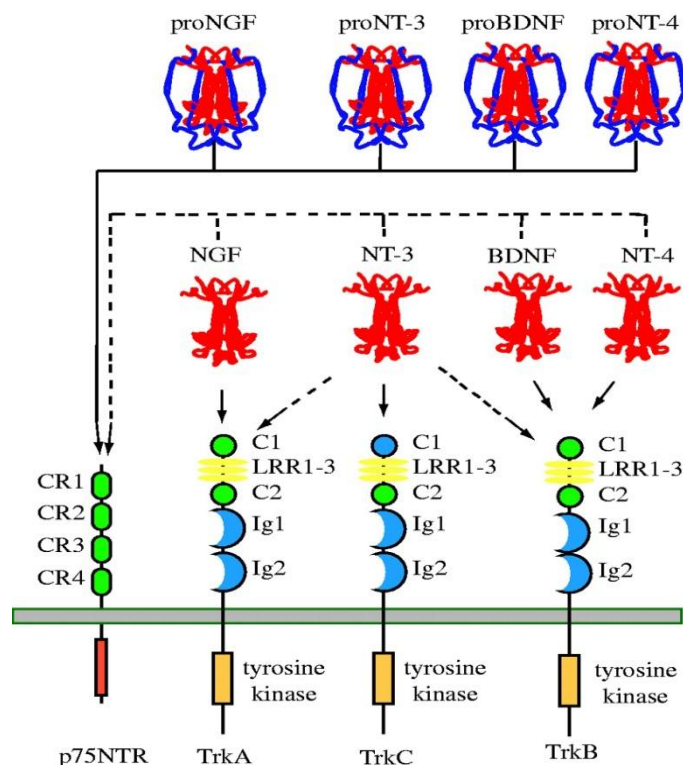
Tra le varie NT l'NGF, scoperto da Rita Levi Montalcini e Stanley Cohen negli anni '50 è un fattore di crescita che riveste notevole importanza, essendo coinvolto nei processi di crescita, sopravvivenza e differenziamento dei neuroni colinergici a livello del sistema nervoso centrale e dei neuroni simpatici e sensoriali a livello del sistema nervoso periferico. L'NGF sembrerebbe inoltre agire anche a livello di cellule non neuronali, come quelle del sistema endocrino ed immunitario (Lambiasi A. et al., 2004). Nel SNC tale fattore viene prodotto a livello dell'ippocampo, della corteccia cerebrale e dell'ipotalamo e agisce legandosi ai recettori presenti sulla membrana dei neuroni colinergici andandone a regolare le funzioni di crescita, sopravvivenza e differenziamento. Per tutta questa serie di implicazioni risulta essenziale per la salute del sistema nervoso, tanto da essere considerato uno dei principali target farmacologici per il trattamento delle patologie neurodegenerative dell'Alzheimer e dell'Huntington (Wallach D. et al., 2002; Chao M.V. et al., 2006). A livello del SNP viene invece prodotto da tessuti bersaglio e agisce legandosi ai recettori dei neuroni sensoriali e simpatico in fase di sviluppo. Il complesso attivo NGF-recettore attiva dalla membrana numerose vie di segnalazione; una di queste induce la dimerizzazione dei monomeri di actina e tubulina e quindi la formazione del citoscheletro a livello del cono di crescita dell'assone. Quest'ultimo è posto ad un'estremità dell'assone ed è caratterizzato da elementi mobili che sondano i segnali ambientali e decidono, seguendo il gradiente di concentrazione dell'NGF, in che direzione allungare l'assone per andare a contattare la cellula bersaglio. Inoltre, il complesso attivo NGF-recettore viene internalizzato in "endosomi segnale", tramite i quali, attraverso un movimento di tipo retrogrado risale attraverso l'assone e arriva al soma, dove va a regolare i processi di sopravvivenza durante l'intera vita neuronale (Ginty D.D. et al., 2002).

Le principali azioni trofiche dell'NGF sono mediate grazie alla sua interazione ad alta affinità con un recettore appartenente alla famiglia dei Trk, TrkA, la cui struttura e funzione sarà illustrata in dettaglio nel paragrafo successivo.

## 1.2. Il recettore TrkA

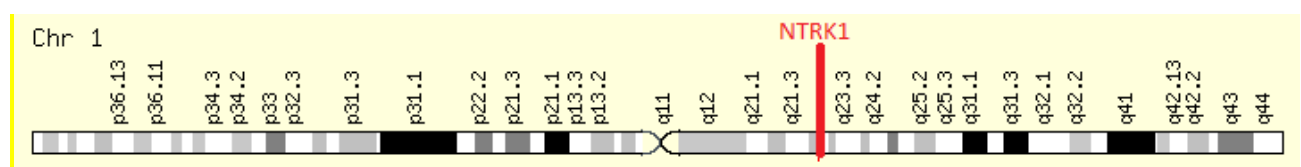
La famiglia dei recettori Trk appartiene alla più grande famiglia dei recettori tirosin-chinasici (RTK), i quali vanno incontro ad una dimerizzazione indotta da ligando, seguita da un processo di attivazione recettoriale che prevede la trans-fosforilazione del dominio intracellulare (*intracellular domain*, ICD) e conseguente fosforilazione degli effettori citoplasmatici. In letteratura vi sono però evidenze che mostrano come membri della famiglia RTK possano essere già presenti in forma di dimeri o *cluster* di dimeri anche in assenza di ligando, il quale sembrerebbe invece avere solamente il compito di andare ad attivare e/o aumentare i processi di segnalazione intracellulari (Casaletto J.B. et al., 2012). Esistono diversi membri della famiglia Trk, che riconoscono selettivamente diverse NT, come rappresentato schematicamente in Figura 1.2:

- TrkA: lega ad alta affinità NGF e con affinità minore NT-3 promuovendo l'attivazione di vie di segnalazione differenti, che mediano i processi di crescita, differenziamento e sopravvivenza neuronale. (Reichard L.F. et al., 2006; Chao M.L. et al., 2003). La risposta mediata da NGF regola anche la crescita dei coni, la motilità e l'espressione di geni codificanti per enzimi coinvolti nella sintesi dei neurotrasmettitori.
- TrkB: viene legato e attivato dalle neurotrofine BDNF, NT-3 e NT-4. BDNF è un fattore di crescita fondamentale nella sopravvivenza e funzione dei neuroni del sistema nervoso centrale; il legame con il recettore TrkB innesca una serie di cascate di segnale a livello intracellulare che regolano i processi di sviluppo neuronale, plasticità e apoptosi.
- TrkC: viene legato dalla neurotrofina NT-3. Tale recettore è espresso a livello dei neuroni sensoriali propriocettori ed è implicato anche in processi di crescita e sopravvivenza a livello dei tessuti tumorali nell'uomo.



**Figura 1.2. Rappresentazione schematica del legame di pro-NT e NT ai recettori Trk e P75NTR.** Differenti NT e rispettive pro-NT legano diversi recettori della famiglia dei Trk, al contrario di quello che avviene per il recettore P75NTR, riconosciuto sia da tutte le NT che dalle rispettive proNT. Le frecce tratteggiate indicano bassa affinità di legame, quelle continue alta affinità di legame (immagine tratta da Reichardt L.S. et al., 2006).

Il gene codificante per il recettore TrkA in *Homo Sapiens* è *Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1 (NTRK1)*, localizzato a livello del cromosoma 1 in posizione 1q21-q22 (Weier et al., 1995). Il gene *NTRK1* ha una lunghezza di 23 Kb (Indo Y. et al., 1997; Greco A. et al., 1999) e presenta un'alta omologia di sequenza con i corrispettivi geni di diverse specie quali *Mus Musculus* e *Rat Norvegicus*.



**Figura 1.3. Rappresentazione schematica del cromosoma 1 con relativa posizione di *NTRK1* in 1q21-q22.**

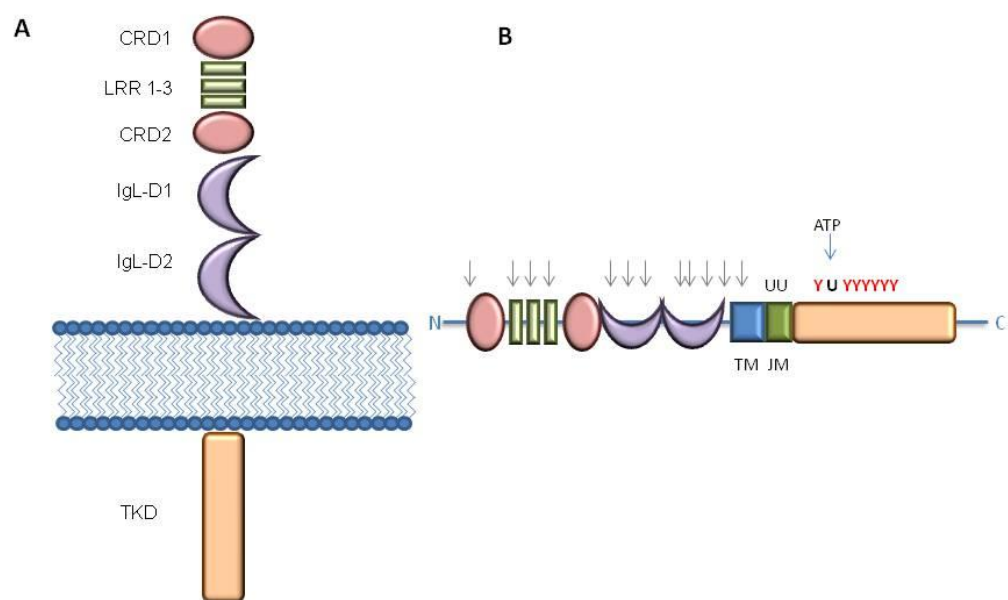
A partire da un mRNA avente lunghezza di 2680 bp possono essere sintetizzate 3 diverse isoforme derivate da *splicing* alternativo e distinte per localizzazione: l'isoforma

TrkA-I è presente a livello di tessuti non neuronali, l'isoforma TrkA-II è espressa soprattutto nei tessuti neuronali, infine l'isoforma III è presente a livello delle cellule staminali neuronali pluripotenti e dei progenitori di creste neurali (Barker P.A. et al., 1993; Tacconelli A. et al., 2004). L'isoforma II, usata anche in questo lavoro di tesi, genera una proteina costituita da 796 aminoacidi, per un peso complessivo di 87497 Da; la proteina matura ha una sequenza compresa tra gli aminoacidi 33-796: i primi 32 aminoacidi costituiscono infatti la sequenza segnale necessaria per dirigere la proteina a livello del reticolo endoplasmatico dove tale sequenza verrà rimossa e la proteina quindi N-glicosilata a livello di numerosi residui prima di essere traslocata sulla membrana plasmatica. Tale processo di N-glicosilazione, il quale avviene a carico di residui di asparagina, comporta un aumento del peso molecolare della proteina, con la formazione di due forme glicosilate caratterizzate rispettivamente dal peso molecolare di 110 e 140 KDa.

TrkA, dal punto di vista strutturale può essere suddiviso in tre domini (Figura 1.4):

- Il **dominio extracellulare** (ECD) ha un peso di circa 42900 Da ed è caratterizzato dalla presenza di:
  - (a) 2 domini IgL-D (*Immunoglobulin-like domain*) richiesti per il legame specifico con il ligando; il secondo dominio IgL-D è quello maggiormente coinvolto nel legame all'NGF (Wiesmann et al., 1999);
  - (b) 2 domini ricchi di cisteine CRD (CRD1 e CRD2);
  - (c) Tra i due domini CDR è presente una sequenza di 3 ripetizioni di leucine LRR (LRR 1-3) all'N-terminale.
- Il **dominio transmembrana** (TM) ha un peso di 1650 Da ed è costituito da una singola alfa-elica idrofobica che attraversa il doppio strato fosfolipidico; a questo livello è presente una sequenza che è stata riportata avere un ruolo nel riciclo del recettore, a seguito della sua internalizzazione (Chen Z.Y. et al., 2005).
- Il **dominio intracellulare** (ICD) ha un peso di 39160 Da ed è caratterizzato da:
  - (a) un sito attivo di legame per l'adenosinatrifosfato (ATP), preceduto da una breve ansa;
  - (b) un dominio tirosin- chinasi (TKD), nel quale è presente una sequenza adiacente al sito attivo, indicata col nome di *labbro di fosforilazione*, che possiede alcuni residui di tirosina la cui fosforilazione è il primo step necessario all'attivazione recettoriale.

In seguito al legame con il ligando, TrkA opera un cambio conformazionale all’N-terminale che ne aumenta la tendenza a dimerizzare; inoltre a questo punto viene attivato un processo di trans-fosforilazione delle tirosine presenti a livello del labbro di fosforilazione di ciascun monomero. Questo processo promuove la fosforilazione anche degli altri residui di tirosina del dominio ICD, che sono così in grado di legare gli effettori intracellulari responsabili dell’attivazione delle vie di segnalazione indotte dal ligando.



**Figura 1.4. Rappresentazione schematica dei domini del recettore TrkA.** A) Elenco degli elementi caratterizzanti i domini ECD, TM e ICD del recettore TrkA. B) Nel dominio ECD le freccette indicano i siti sottoposti ai processi di N-glicosilazione, mentre a livello del dominio ICD sono indicati i residui di tirosina (Y) coinvolti sia nell’attività chinasi che nel reclutamento di effettori intracellulari. Le lettere U indicano i residui di lisina coinvolti nel processo di ubiquitinazione, nello specifico il residuo di lisina del dominio ICD è anche sito di legame per l’ATP. I domini indicati con TM e JM sono rispettivamente i domini transmembrana e juxtamembrana (immagine tratta e riadattata da Marchetti L. et al., 2015).

In seguito all’attivazione del recettore vengono promosse differenti vie di segnalazione, a partire da differenti residui di tirosina; questi infatti una volta fosforilati sono in grado di

reclutare gli effettori citoplasmatici Fosfolipasi-C-Gamma (*PLC-gamma*), Fosfatidilinositolo-3 Kinase (*PI3K*) e altre proteine attrattive come SHC/GAB, come riportato in Figura 1.5. Ciascuna via di segnalazione va a regolare specifiche funzioni svolte dal recettore TrkA; queste verranno di seguito elencate, facendo riferimento alla numerazione delle tirosine del cDNA di ratto, dato che questo è quello usato in questo lavoro di tesi (le conversioni nei rispettivi residui aminoacidici delle sequenze di cDNA di topo e di uomo sono riportate nella Tabella 1.1).

Homo Sapiens		Mus Musculus		Rattus Norvegicus	
Residuo	Sequenza	Residuo	Sequenza	Residuo	Sequenza
Y-496	HIIENPQYFSDA CVH	Y-499	HIMENPQYFSDT CVH	Y-499	HIMENPQYFSTD CVH
Y-676	FGMSRDIYSTD YYRV	Y-679	FGMSRDIYSTD YYRV	Y-679	FGMSRDIYSTDy YRV
Y-680	RDIYSTDYRV GGRT	Y-683	RDIYSTDYRV GGR	Y-683	RDIYSTDYRV GGRT
Y-681	DIYSTDYRVG GRTM	Y-684	DIYSTDYRVG GRTM	Y-684	DIYSTDYRVG GRTM
Y-701	MPPEsILYRKf TTES	Y-704	MPPEsILYRKf STES	Y-704	MPPEsILYRKfS TES
Y-757	RACPPEVYAIM RGCW	Y-760	RACPPDVYAIM RGCW	Y-760	RACPPDVYAIM RGCW
Y-791	LAQAPPVYLDV LG	Y-794	LAQAPPSYLDV LG	Y-794	LAQAPPSYLDV LG

**Tabella 1.1. Tabella di confronto delle sequenze a livello del dominio ICD (ICD) di TrkA tra *H.Sapiens*, *M.Musculus* e *R.Norvegicus*.** Nella tabella sono riportati i residui di tirosina soggetti a fosforilazione (indicati con la lettera Y in rosso) e le relative sequenze aminoacidiche in cui sono inseriti a livello dell'ICD di TrkA di uomo, topo e ratto. In particolare i residui evidenziati sono quelli coinvolti nell'attività tirosin-chinasica e di reclutamento di effettori intracellulari (Indo Y. et al., 1997; Ota T. et al., 2004).

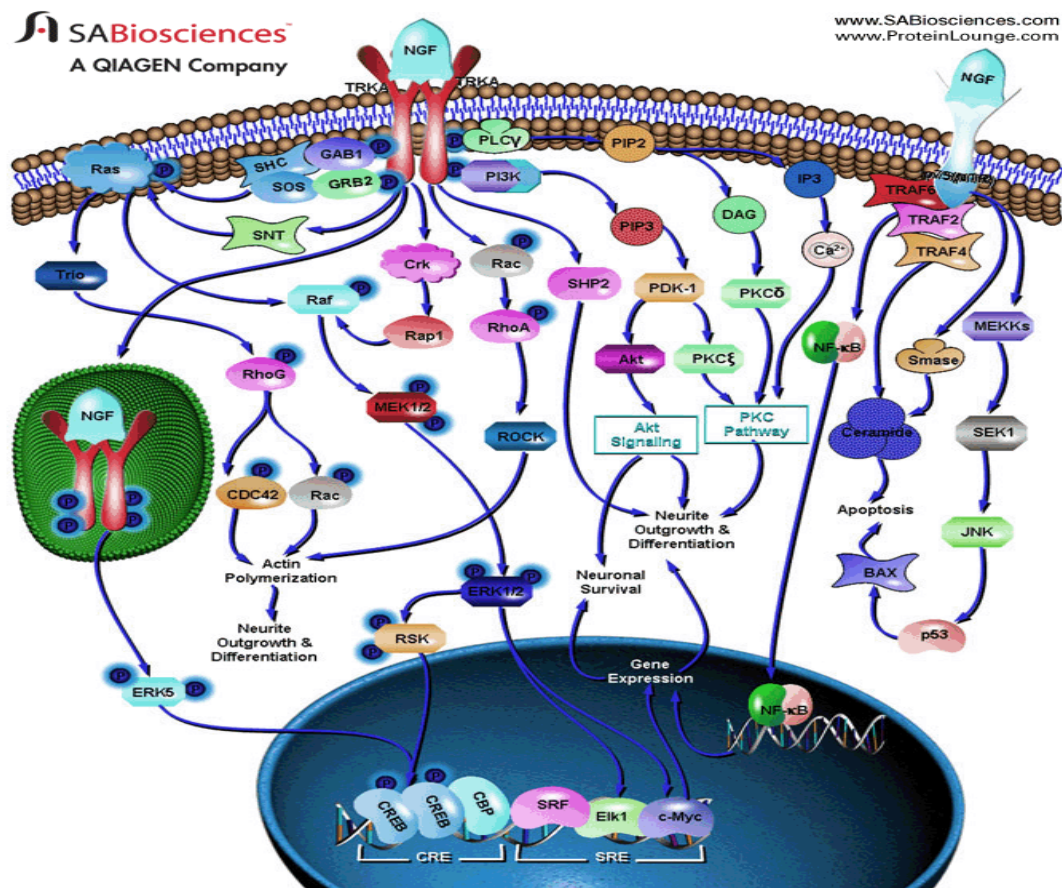
- Residuo **Y499**: regolazione della crescita neuritica e differenziamento. Il residuo di tirosina fosforilato lega le proteine adattatrici GAB1(*GRB2-Associated Binding Protein-1*) e SHC (*SH2 Containing Protein*), promuovendo la loro associazione con GBR2-SOS (*Growth Factor Receptor-Bound Protein-2-SOS*), un complesso che regola lo scambio GDP-GTP su Ras, promuovendo l'attivazione della via di Ras. Ras attivato va a legare Raf, il quale fosforila e attiva MEK (MAPK/ERK Kinase) che, grazie alla sua duplice azione chinastica, fosforila e attiva a sua volta MAPKs-ERK1/2 (*Mitogen-Activated Proteins-Extracellular signal-regulated Kinase*). A questo punto ERK 1/2 può intraprendere due destini, o trasloca nel nucleo dove va a fosforilare il fattore di trascrizione Elk1 o va a fosforilare RSK (*Ribosomal S6 Kinase*). Elk1 fosforilato può interagire con il fattore di trascrizione SRF (*Serum Response Factor*), dopo che questo si è legato alla sequenza SRE (*Serum Response Element*) presente all'interno del promotore di c-Fos, contribuendo così all'avvio della trascrizione. La fosforilazione di RSK comporta la sua traslocazione a livello nucleare dove fosforila il fattore di trascrizione CREB (*Cyclic Adenosine Monophosphate (c-AMP) Response Element Binding Protein*), il quale lega il coattivatore trascrizionale CBP(*CREB Binding Protein*) e il complesso SRF-Elk che vanno a formare un complesso che guida la trascrizione di c-Fos. L'attivazione dei fattori di trascrizione media l'espressione di geni indotti da NGF, andando così a regolare la crescita neuritica. Crk e SNT possono al contempo modulare l'attività di MAPK in cellule neuronali. La G-proteina Rap-1 posta a valle di Crk si connette con la via delle MAPK grazie a legame con Raf attivata, mentre SNT contribuisce all'attivazione di Ras (Freud-Michel V. et al., 2005; Chao M.V. et al., 2006; Cheung E.C. et al., 2004; Schramm A. et al., 2005). A livello periferico, la fosforilazione di CREB richiede l'attivazione e successiva internalizzazione di TrkA a livello del terminale assonico all'interno di vescicole che daranno origine a endosomi i quali migreranno dal terminale assonico al corpo cellulare dei neuroni. Il legame dell'NGF a TrkA determina l'attivazione a livello del terminale assonico di ERK 1/2 e l'attivazione di ERK5 a livello del soma. I fattori attivati dalla cascata di ERK5 vengono quindi trasportati attraverso gli endosomi, traslocano a livello nucleare dove vanno a mediare sia la fosforilazione del fattore CREB, sia l'espressione genica (Watson F.L. et al., 2001). Un altro fattore coinvolto nei processi di crescita neuritica e differenziamento, è una GTPasi appartenente alla

famiglia delle Rho, RhoG, che viene attivato da Trio (*Triple Functional Domain-PTPRF Interacting*) e attiva a sua volta i fattori Rac e CDC42, coinvolti nel processo di polimerizzazione dell'actina fondamentale per la crescita neuritica e il differenziamento (Negishi M. et al., 2002).

- Residuo **Y794**: crescita neuritica e differenziamento. Al residuo in questione si lega PLC-gamma il quale catalizza la formazione di Diacilglicerolo (DAG) e di Inositolo Trifosfato (IP3) a partire da Fosfatidilinositolo 4,5-Bisfosfato (PIP2). DAG e IP3 vanno a stimolare rispettivamente PCK-Delta (*Protein Kinase-C-Delta*) e un aumento del livello di  $Ca^{2+}$  intracellulare, che inducono riarrangiamenti a livello citoscheletrico essenziali sia per la crescita neuritica sia per il processo di differenziamento. Il residuo Y794 è anche coinvolto nella regolazione dell'ubiquitinazione di TrkA ad opera dell'ubiquitina-ligasi E3 *Nedd4-2*; dunque sia *Nedd4-2* che PLC-gamma competono per il legame allo stesso residuo di tirosina e l'interazione del recettore con l'uno o con l'altro dipende solo dalla fosforilazione a carico del residuo. Il processo di ubiquitinazione di TrkA non è stato ancora chiarito nei dettagli, ed è rimasto argomento di dibattito (Geetha T. et al., 2005; Arèvalo J.C. et al., 2006).
- Residuo **Y760**: regolazione della sopravvivenza neuronale, crescita neuritica e differenziamento. A livello di tale residuo avviene il legame con Fosfatidilinositolo-3 Chinasi (PI3K), il quale a livello della membrana plasmatica converte il PIP2 in Fosfatidilinositolo 3,4,5-Trisfosfato (PIP3), il quale può andare ad attivare la protein- chinasi PDK-1 (*Phosphatidylinositol Dependent Kinase-1*). PDK-1 a sua volta fosforila l'enzima serin-treonin chinasi Akt, il quale attiva effettori a valle coinvolti nei processi di sopravvivenza e differenziamento neuronale. PDK-1 può contribuire alla crescita dei neuriti anche attraverso l'attivazione della via di PCK-Zeta (*Protein Kinase-C-Zeta*) (Schramm A. et al., 2005). Akt sopprime i processi di morte cellulare programmata attraverso la fosforilazione e quindi inattivazione di GSK3-Beta (*Glycogen Synthase Kinase-3-Beta*), del FKHRL1(*Forkhead Transcription Factor*) e delle proteine apoptotiche BAD (*BCL2 Associated Death Promoter*) e Caspasi-9; infine agisce anche sopprimendo i livelli di p53, l'oncosoppressore che funge da sensore del danno e regola i processi di morte cellulare. La via di Akt va a regolare anche la trascrizione dei fattori CREB e NF-KappaB (*Nuclear Factor-KappaB*), coinvolti nella regolazione della sopravvivenza



cellulare. Il fattore CREB attivato stimola la trascrizione di fattori essenziali per la sopravvivenza, mentre la fosforilazione dei fattori BAD, FKHRL1 e Caspasi-9 va ad inibire i processi pro-apoptotici (Freund Michel V. et al., 2006; Schramm A. et al., 2005). L'effetto dell'attivazione di TrkA indotta dal legame con l'NGF comporta anche la polimerizzazione dell'actina attraverso la via che da Rac, attiva RhoA e quindi la via di ROCK (*Rho-Associated Coiled-Coil-Containing protein Kinase*) (Negishi M. et al., 2002).



**Figura 1.5. Rappresentazione schematica delle vie di segnalazione attivate da NGF.** Illustrazione delle cascate di segnalazione indotte da NGF in seguito al legame coi i recettori TrkA (a sinistra) e P75 (a destra) (immagine tratta dal sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

È stato osservato che quando TrkA si trova associato al recettore P75NTR aumenta di circa 100 volte la sua affinità per il ligando (Ho R. et al., 2011). Il supporto di P75 alla sopravvivenza cellulare avverrebbe attraverso un potenziamento indiretto della via di trasduzione di TrkA: la modalità d'interazione tra i due recettori è ancora argomento di grande dibattito. Ci sono altre ipotesi d'interazione e da lavori recenti è stato evidenziato

un processo di signalling a due step: TrkA inizia fosforilando e attivando TACE, che taglia il dominio ICD di P75, a livello di endosomi. Il dominio ICD rilasciato è libero di andare ad attivare le vie di Ras, PLC-gamma, PI3K-Akt, potenziando la via di sopravvivenza regolata dal recettore TrkA (Ceni C. *et al.*, 2010). Uno dei fattori target su cui agiscono tali vie è NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), il quale va a regolare la trascrizione dei geni coinvolti nella sopravvivenza cellulare (Foehr ED *et al.*, 2000).

Come già scritto precedentemente, il recettore TrkA in seguito al legame con il ligando NGF va incontro ad un processo d'internalizzazione. Il complesso recettore-ligando presente a livello della membrana plasmatica viene internalizzato all'interno di vescicole, quindi indirizzato a due possibili vie. Nel primo caso, che tipicamente caratterizza l'internalizzazione di complessi NGF-TrkA nelle porzioni assionali distali di neuroni periferici, gli endosomi sono ridiretti al soma della cellula neuronale diventando "endosomi segnale". In questo caso, i complessi recettoriali attivati presenti all'interno degli endosomi risaliranno l'assone fino al soma con un tipo di movimento retrogrado, già citato nel paragrafo 1.1. Nel secondo caso, tipico per esempio della segnalazione indotta da NGF nel soma, il complesso NGF-recettore internalizzato in vescicole di endosomi precoci può intraprendere due vie differenti: ritornare a livello della membrana attraverso endosomi di riciclo o proseguire il suo cammino a livello di endosomi tardivi, quindi successivamente andare nei lisosomi per essere degradato. È stato osservato inoltre che un'inibizione dell'attività chinasi di TrkA sarebbe proprio responsabile dello scambio tra la via degradativa e quella di riciclo (Alderson I.F. *et al.*, 2000; Gheeta T. *et al.*, 2008). Prima di arrivare al lisosoma il recettore viene comunque convogliato al complesso proteico del proteosoma per essere spogliato delle molecole di ubiquitina (necessarie per il processo di internalizzazione) (Geetha T. *et al.*, 2008). Il meccanismo d'internalizzazione usato da TrkA nella maggior parte dei casi è quello clatrina-dipendente; i complessi recettore-ligando così internalizzati vengono convogliati ad endosomi segnale, di riciclo o di degradazione. Da uno studio relativamente recente (Pryor S. *et al.*, 2012) è emerso che, in alcuni casi, il recettore TrkA si localizza in zattere lipidiche presenti a livello di membrana per poi essere internalizzato, in seguito al legame con l'NGF, attraverso un meccanismo caveolina-dipendente. In quest'ultimo caso il recettore, anche in presenza di NGF, non è fosforilato e quindi non può svolgere la funzione di endosoma segnale coinvolto nell'attivazione di vie di segnalazione

intracellulari; al contrario è stato osservato un suo coinvolgimento nella risposta di tipo locale, sembrerebbe infatti coinvolto nel reclutamento di microtubuli per la crescita dei coni assonali.

Vengono riportate di seguito per completezza altre funzioni svolte dal recettore TrkA:

- Potenzimento della via di segnalazione attivata da TrkB: TrkA va a stimolare la fosforilazione dell'enzima TACE/ADAM17, il quale induce le aspartil-proteasi  $\alpha$ -secretasi e  $\beta$ -secretasi ad effettuare un taglio proteolitico su P75<sup>NTR</sup>, che rilascia il proprio dominio ICD; tale dominio va a potenziare la via di segnalazione di TrkB (Bibel M. et al., 1999; Huang E.J. et al., 2003).
- Coinvolgimento nei processi di apprendimento e memoria: nel sistema nervoso centrale il recettore TrkA è espresso a livello dei neuroni colinergici coinvolti nei processi di memoria ed apprendimento; la degenerazione di tali neuroni rappresenta uno degli effetti più caratterizzanti il Morbo di Alzheimer. È stato dimostrato, in esperimenti condotti su topi *wild-type* e topi APP (modelli per la malattia del Morbo di Alzheimer), che l'attivazione selettiva dei recettori TrkA mediante un agonista farmacologico che lega TrkA ma non P75 ha effetto sulle capacità cognitive. In topi APP l'attivazione di TrkA da parte dell'agonista aumenta sia l'apprendimento che la memoria a breve termine (non ci sono effetti sulla memoria a lungo termine), effetto dovuto molto probabilmente alla riduzione dei livelli del peptide beta-amiloide e all'aumento dell'attività della chinasi Akt a livello dell'ippocampo e della corteccia. In topi *wild-type* invece non vi sono effetti nelle risposte di apprendimento e memoria a breve termine, al contrario l'attivazione selettiva del recettore da parte dell'agonista sembrerebbe aumentare il deficit a livello della risposta a lungo termine nell'ippocampo, effetto correlabile all'aumentata attività di Akt e all'aumento del rilascio del precursore di BDNF (Aboukassim T. et al., 2011).
- Ruolo nella regolazione dell'aging di neuroni colinergici: è stato dimostrato (Parikh V. et al., 2013) che la soppressione dell'espressione di TrkA compromette il livello d'attenzione in ratti anziani.
- Ruolo nel differenziamento di cellule B del sistema immunitario: l'alta frequenza di TrkA e P75 a livello del sistema immunitario hanno suggerito un ruolo fondamentale della risposta mediata da NGF a livello del sistema immunitario e nella fattispecie nello sviluppo degli organi linfoidei. Mutanti di TrkA causano livelli

anomali di immunoglobuline a livello del siero e accumulo di linfociti B a livello peritoneale, mentre non comportano danni a livello della risposta mediata da cellule B della memoria e dei linfociti T (Coppola V. et al., 2004).

### 1.3. Mutazioni a carico del recettore TrkA

L'importanza delle funzioni biologiche svolte dal recettore TrkA è provata dall'evidenza che deregolazioni del gene *NTRK1* possono comportare l'insorgenza di svariate patologie. Ad esempio, è stato osservato come una diminuzione dei livelli di TrkA e quindi della via di segnalazione indotta da NGF, comporti una degenerazione dei neuroni colinergici responsabile dell'insorgenza del morbo di Alzheimer (Count S.E. et al., 2004). Nella Leucemia Mieloide Acuta (AML), la traslocazione cromosomica t(8;21) è stata vista causare anche un aumento dei livelli di *NTRK1* (Mulloy J.C. et al., 2005). Un altro studio del 2005 (Lambiase A. et al., 2005) ha dimostrato il coinvolgimento del recettore TrkA nell'insorgenza del cheratocono, patologia degenerativa della cornea che può colpire o uno o entrambi gli occhi. Nei pazienti affetti da tale patologia sono totalmente assenti, a livello delle cellule epiteliali congiuntivali e corneali umane, sia i recettori TrkA che P75NTR, mentre il livello di NGF risulta molto diminuito. Riarrangiamenti cromosomici a carico del gene *NTRK1* sono responsabili della produzione di uno degli oncogeni caratteristici del carcinoma papillare della tiroide, *NTRK1/TPM3* (TRK). Tale oncogene viene ottenuto dalla fusione del dominio tirosin-chinasico del recettore con i 221 aminoacidi N-terminali della proteina TPM3, una tropomiosina non muscolare; lo stesso gruppo di ricerca che ha studiato tale argomento (Greco A. et al., 1993) ha scoperto che nel tumore alla tiroide i riarrangiamenti cromosomici a carico del gene *NTRK1* possono avvenire con 3 diversi geni: TPM3, TPR e infine il gene TAG. A livello del sistema nervoso periferico, alterazioni del recettore TrkA inducono l'insorgenza della patologia dell'insensibilità congenita al dolore con anidrosi, più brevemente definita CIPA (*Congenital Insensitivity to Pain with Anhidrosis*). Nel 1999 (Mardy S. et al., 1999) furono identificate almeno 11 mutazioni a carico del gene *NTRK1* responsabili dell'insorgenza della patologia, di cui 6 missenso, 2 *frameshift*, 1 mutazione non senso e 2 mutazioni in siti di *splicing*. Tali mutazioni sono distribuite a livello di ECD e di ICD. Inoltre negli affetti sono state trovate, sullo stesso cromosoma, due mutazioni associate: una conversione arginina-serina in posizione 85 e una conversione istidina-tirosina in posizione 598; è stata anche trovata una

mutazione glicina-valina in posizione 607 della sequenza. Queste tre mutazioni rappresentano, molto probabilmente, doppie e triple mutazioni. Il gene *NTRK1* è stato studiato in 46 cromosomi di individui affetti da CIPA selezionati tra 23 famiglie giapponesi e anche in questo studio (Miura Y. Et al., 2000) sono state riscontrate 11 mutazioni: 4 di queste sono mutazioni missenso che comportano una sostituzione amminoacidica a livello di un dominio conservato nella famiglia dei TRK, 3 sono mutazioni *frameshift* e 3 non-senso, una delle quali sita all'interno di un introne, la quale causa *splicing* aberrante in vitro. Nel 2001 il gruppo di ricerca di Mardy e collaboratori induce una serie di mutazioni nel cDNA di TrkA che inducono l'insorgenza della patologia CIPA, allo scopo di valutare se vi è o meno l'alterazione del processo di autofosforilazione in cellule neuronali e non stimulate con NGF. Vengono indotte due mutazioni a livello del dominio extra-cellulare che mostrano una diminuzione del processo autofosforilativo in cellule neuronali; 5 mutazioni vengono invece indotte nel dominio ICD ad attività chinasi e queste mostrano una riduzione dell'autofosforilazione sia in cellule neuronali che non. Inoltre le mutazioni prima citate come doppie o triple mutazioni, ovvero la conversione arginina-serina in posizione 85, la conversione istidina-tirosina in posizione 598 e la mutazione glicina-valina in posizione 607 del cromosoma vengono definite come possibili polimorfismi tipici di una determinata popolazione etnica (Mardy S. et al., 2001). Una mutazione che comporta la sostituzione di un residuo di tirosina in uno di serina a livello del nucleotide 509 è responsabile dell'insorgenza di una grave neuropatia, ovvero l' HSAN5 (*Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy type V*), la quale è molto simile alla CIPA ma è anche caratterizzata da una drastica riduzione della mielinizzazione di fibre nervose a calibro minore.

Nella seguente tabella sono elencate le varianti alleliche patologiche maggiormente riportate per il gene *NTRK1*:

<b>Varianti alleliche e patologia</b>	<b>Tipo di mutazione</b>	<b>Commenti</b>
<u><b><i>NTRK1</i>, 1-BP DEL, 1726C</b></u>  <u><b>-CIPA-</b></u>	Delezione di una singola base C in posizione 1726 dell'esone C.	La delezione è all'interno del dominio TK, causa <i>frameshift</i> e codoni di stop prematuri a livello dell'esone 14 (Indo Y. et al., 1996; Miura Y. et al., 2000).
<u><b><i>NTRK1</i>, IVSDS, A-C, +3 –</b></u>  <u><b>-CIPA-</b></u>	Delezione dell'esone D, compreso tra i nucleotidi 1872-2112 su un'allele di <i>NTRK1</i> ; delezione sull'altro allele dello stesso esone compreso tra i nucleotidi 1926-2112.	La delezione parziale dell'esone è dovuta alla presenza di un sito donatore di splicing al 5' di un introne compreso tra l'esone D ed E, che presenta una conversione di basi A-C in terza posizione (Indo Y. et al., 1996).
<u><b><i>NTRK1</i>, GLY571ARG</b></u>  <u><b>-CIPA-</b></u>	Sostituzione glicina-arginina in posizione 571, dovuta a conversione G-C in posizione 1796 dell'esone C.	La glicina 571 è un residuo presente a livello del dominio TK ed è conservato in almeno 14 recettori RTK, tra cui anche TrkB e TrkC (Indo Y. et al., 1996).
<u><b><i>NTRK1</i>, ARG774PRO</b></u>  <u><b>-CIPA-</b></u>	Sostituzione arginina-prolina in posizione 774, dovuta alla conversione di basi G-C a livello del nucleotide 2405.	Mutazione associata a perdita di funzione.
<u><b><i>NTRK1</i>, GLN9TER, HIS598TYR, GLY607VAL</b></u>  <u><b>-CIPA-</b></u>	Tripla mutazione in esone 1 e 15 di <i>NTRK1</i> : 1 mutazione non-senso (in posizione 9) e due missenso (in posizione 598 e 607).	Le mutazioni missenso si è scoperto essere poi polimorfismi caratteristici di una data popolazione (Mardy S. et al., 2001).

<u><b>NTRK1, IVS4, G-C, -1 AND ARG85SER</b></u>  <u><b>-CIPA-</b></u>	Doppia mutazione: conversione G-C nell'esone 4 e conversione C-A in posizione 337 dell'esone 2 che comporta la sostituzione arginina-serina in posizione 85.	La sostituzione arg85ser si è scoperto essere un polimorfismo caratteristico di una data popolazione (Mardy S. et al., 2001).
<u><b>NTRK1, IVS7AS, T-A, -33 –</b></u>  <u><b>-CIPA-</b></u>	Mutazione IVS7AS-33 T-A, all'interno dell'introne.	Tale mutazione causa <i>splicing</i> aberrante in vitro.
<u><b>NTRK1, TYR604HIS</b></u>  <u><b>-Carcinoma Tiroideo-</b></u>	Sostituzione tirosina-istidina in posizione 604 dell'esone 15 (C1810T).	Tale variazione di sequenza sembrerebbe essere in <i>Linkage-disequilibrium</i> con la sostituzione VAL613GLY (Gimm O. et al., 1999).
<u><b>NTRK1, VAL613GLY</b></u>  <u><b>-Carcinoma Tiroideo-</b></u>	Sostituzione valina-glicina in posizione 613 (G1838T) dell'esone 15.	Tale variazione di sequenza sembrerebbe essere in <i>Linkage-disequilibrium</i> con la sostituzione TYR604HIS (Gimm O. et al., 1999).
<u><b>NTRK1, 1-BP INS, 1926T</b></u>  <u><b>-CIPA-</b></u>	Inserzione di 1 bp in posizione 1926 nel gene <i>NTRK1</i> .	InfoRMazione ricavata da uno studio su 16 famiglie di Beduini del sud dell' Israele-Negev (Shatzky S. et al., 2000).
<u><b>NTRK1, PRO689LEU</b></u>  <u><b>-CIPA-</b></u>	Sostituzione prolina-leucina in posizione 689.	Informazione ricavata da un ristretto gruppo di Beduini del nord Israele (Shatzky S. et al., 2000).
<u><b>NTRK1, TYR359CYS</b></u>  <u><b>-HSAN-5-</b></u>	Mutazione missenso tirosina-cisteina in posizione 359 dell'esone 8.	Tale mutazione in omozigosi provoca l'insorgenza di una forma variante della CIPA, ovvero l'HSAN-5 caratterizzata in più dalla perdita della mielina a livello

		delle fibre nervose più piccole.
<u><b>NTRK1, MET581VAL</b></u>  <u><b>-CIPA-</b></u>	Sostituzione metionina-valina in posizione 581, dovuta alla conversione A-G nel nucleotide 1825 dell'esone 14.	La mutazione metionina-valida cade nel dominio TK del recettore (Miranda C. et al., 2002).
<u><b>NTRK1, 2-BP DEL, 207TG</b></u>  <u><b>-CIPA-</b></u>	Delezione di una sequenza di 2 bp in posizione 207 dell'esone 1, la quale comporta <i>frameshift</i> e codoni di <i>terminazione</i> prematuri.	La delezione 207TG, per la sua origine ancestrale a diverse popolazioni potrebbe essere una mutazione fondatrice (Suriu C. et al., 2009).
<u><b>NTRK1, GLY517GLU</b></u>  <u><b>-CIPA-</b></u>	Sostituzione glicina-glutammato per sostituzione G-A in posizione 1550.	Tale mutazione è stata vista associata al ridotto segnale del calcio in seguito alla stimolazione del recettore TrkA con NGF (Hepburn L. et al., 2014).
<u><b>NTRK1, IVS6DS, A-T, +4</b></u>  <u><b>-CIPA-</b></u>	Conversione A-T nell'introne 6.	Come effetti si hanno difetti di <i>splicing</i> (Hepburn L. et al., 2014).

**Tabella 1.2. Elenco delle varianti alleliche patologiche maggiormente note del gene *NTRK1*.** In tale tabella vengono riportate le varianti alleliche con relativa patologia coinvolta, il tipo di modifica a carico dei residui e gli effetti che possono essere indotti da tali mutazioni.

Come mostrato nella Tabella 1.2, mutazioni a carico di specifici residui del gene codificante per il recettore TrkA possono portare a deregolazioni a livello della funzionalità recettoriale con la conseguente insorgenza di differenti patologie. In particolare, è evidente come anche una singola mutazione della sequenza proteica di TrkA possa alterarne completamente la funzione biologica. Tali evidenze supportano sicuramente approcci sperimentali basati su mutagenesi sito-specifica, come quello



utilizzato in questo lavoro di tesi e spiegato nel capitolo 2 (Scopo della Tesi) e più estesamente nel capitolo 4 (Risultati), per lo studio della funzione biologica del recettore TrkA.

## 1.4. Tecniche di microscopia avanzata per l'analisi di cellule vive

Le tecniche di *imaging* rappresentano oggi un metodo d'elezione per indagare, mediante l'ausilio della microscopia, caratteristiche morfologiche, strutturali e funzionali di campioni biologici. Tra le più usate, la microscopia a fluorescenza ha il grande vantaggio di utilizzare sonde poco o non invasive che consentono il monitoraggio di un ampio spettro di molecole d'interesse. Le sonde possono essere tag proteici intrinsecamente fluorescenti oppure coloranti organici e nanocristalli che possono essere direttamente o indirettamente bioconiugati alle molecole interessate (Fernandez-Suarez M. et al; 2008; Hinner M.J. et al., 2010; Chen Z. et al; 2013). La straordinarietà di tali tecniche innovative risiede nella capacità di queste di offrire una risoluzione vicina o addirittura maggiore del limite di diffrazione della luce (circa 200 nm) e di monitorare i processi di dinamica nella scala dell'ordine dei sub-ms (Hell S.W. et al., 2003; Garcia-Saez A.J. et al., 2007; Cella Zanacchi F. et al., 2011;). Le tecniche di *imaging* avanzato in cellule vive possono essere usate per studiare la dinamica spazio-temporale di proteine espresse sia a livello intracellulare che in membrana plasmatica. Lo studio sulla dinamica di proteine in cellule vive può essere tipicamente affrontato secondo due approcci di microscopia a fluorescenza:

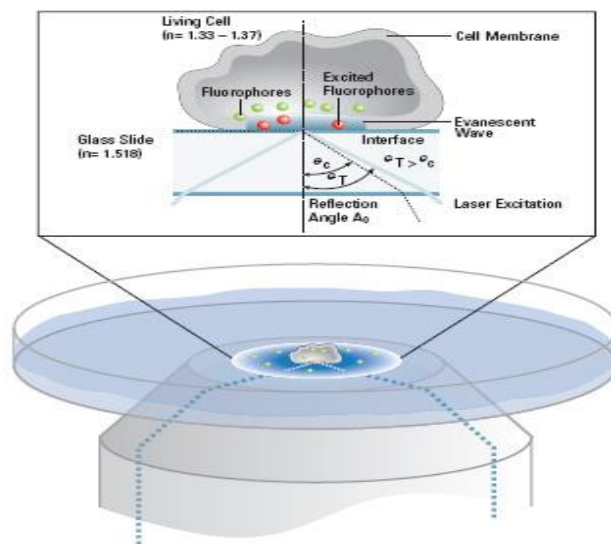
- *BULK Imaging*: approccio di marcatura massiccia utilizzato per monitorare la localizzazione, la dinamica e le interazioni di una popolazione della proteina d'interesse.
- *Single-molecule imaging (SMI)* e *Single-particle tracking (SPT)*: per lo studio di singole molecole della specie d'interesse.

Il *BULK imaging* sfrutta tipicamente la microscopia a fluorescenza, ed in particolare la microscopia confocale per definire le caratteristiche medie di un gran numero di

molecole (tipicamente proteine) marcate con sonde fluorescenti. La microscopia confocale permette di ottenere sezioni ottiche del campione facendo una scansione del volume di osservazione, la sorgente luminosa utilizzata per eccitare le molecole è un laser che viene focalizzato sul campione. Per ottenere un'immagine nitida di una sezione ottica, la luce emessa dal campione passa attraverso un diaframma, detto *pinhole*, confocale con il fuoco del laser, il quale riduce drasticamente il segnale dovuto a fluorofori eccitati fuori dal piano focale. Il *BULK imaging* si può servire della microscopia confocale per acquisire sezioni, lungo i piani *xy*, *xz*, *yz* (dove *z* è la direzione lungo l'asse dell'obiettivo, generalmente coincidente con l'asse di propagazione principale della luce), che consentono di visualizzare lo spessore della cellula e la rispettiva posizione delle molecole marcate; ciò risulta molto vantaggioso nel contesto di studi volti a discriminare molecole internalizzate nella cellula da molecole traslocate e localizzate in membrana. Lo svantaggio principale di questo approccio sta però nel fatto che spesso mediare il comportamento di una specie molecolare può impedire di vedere preziosi dettagli per il semplice fatto che non sono sufficientemente rappresentati nella popolazione oggetto di studio (Marchetti L. et al., 2015). Per ovviare a tale inconveniente sono stati sviluppati, nel corso degli anni, approcci di visualizzazione a singola molecola (SMI): si tratta di tecniche di microscopia super-risolta che consentono il monitoraggio nel tempo di singole molecole della specie d'interesse, fornendo ad esempio informazioni sul comportamento diffusivo di queste, sulle loro interazioni, sullo stato di oligomerizzazione e sull'eventuale formazione di aggregati. In questo caso la posizione di ogni singola molecola marcata è infatti seguita nel tempo e ciascuna traiettoria originata viene analizzata per estrapolare parametri quantitativi che descrivano il tipo di moto tipico delle molecole. Le tecniche SMI e SPT hanno trovato ampio spettro di applicazione nello studio di numerosi processi dinamici in cellule vive, come ad esempio lo studio del trasporto cellulare (Cui B. et al., 2007), infezione virale (Branderburg B. et al., 2007), riarrangiamenti citoscheletrici (Akhmanova A. et al., 2008), dinamica a livello nucleare (Morisaki T. et al., 2014), e studio della dinamica di recettori di membrana (Kusumi A. et al., 2011; Kusumi A. et al., 2014). Non a caso, questo approccio metodologico è stato recentemente classificato tra i metodi di maggior impatto nell'ambito della ricerca biologica degli ultimi 10 anni (Special Issue, Nature Methods., 2014). Quando si effettuano misure di SMI e SPT è fondamentale l'utilizzo di fluorofori brillanti e fotostabili per seguire l'andamento dinamico della molecola oggetto di studio. La GFP ad esempio, è stata largamente

impiegata in diversi studi di *BULK imaging*, ma è meno indicata per quanto riguarda l'analisi a singola molecola, in quanto le traiettorie ottenute da singole molecole marcate con GFP risultano troppo corte e inadatte ad un'analisi della diffusione a lungo termine a causa del fenomeno di *photobleaching* (Hibino K. et al; 2009). Negli studi di SMI e SPT è invece consigliabile usare piccoli fluorofori organici ottimizzati o i Quantum Dot (QDot), nanoparticelle di materiale semiconduttore del diametro di 2-10 nm; entrambi questi fluorofori hanno il vantaggio di poter essere più brillanti e, soprattutto nel caso dei QDot, molto più fotostabili delle proteine fluorescenti.

Se, come in questo lavoro di tesi, le singole molecole oggetto di studio si trovano sulla membrana plasmatica di cellule vive adese al substrato su cui vengono coltivate, è consigliabile l'impiego della microscopia *TIRFm* (*total internal reflection fluorescence microscope*). La microscopia TIRF è una tecnica di microscopia a campo largo, che sfrutta l'incidenza di un fascio collimato di luce laser; questo viene totalmente riflesso a livello dell'interfaccia vetro-acqua, quando viene superato l'angolo di incidenza critico per riflessione totale interna. Tale processo induce solo un'onda evanescente all'interno del campione con una densità d'energia che decresce esponenzialmente man mano che ci si allontana dall'interfaccia (Marchetti L. et al., 2015). Uno dei vantaggi che offre tale tecnica è quella di andare a ridurre il rumore di fondo dovuto al segnale di specie che non si trovano sulla membrana cellulare adesa al substrato, in quanto la fluorescenza delle molecole marcate lontane dall'interfaccia vetro-acqua non viene eccitata (i fluorofori vengono infatti eccitati solo in una stretta regione adiacente all'interfaccia, di solito inferiore ai 200 nm). La parte di membrana sopra citata viene definita "membrana basale" in esperimenti di microscopia su cellule coltivate in petri o su vetrini (per colture non confluenti o al massimo in un monostrato), per distinguerla dalla porzione più distante definita invece membrana apicale.

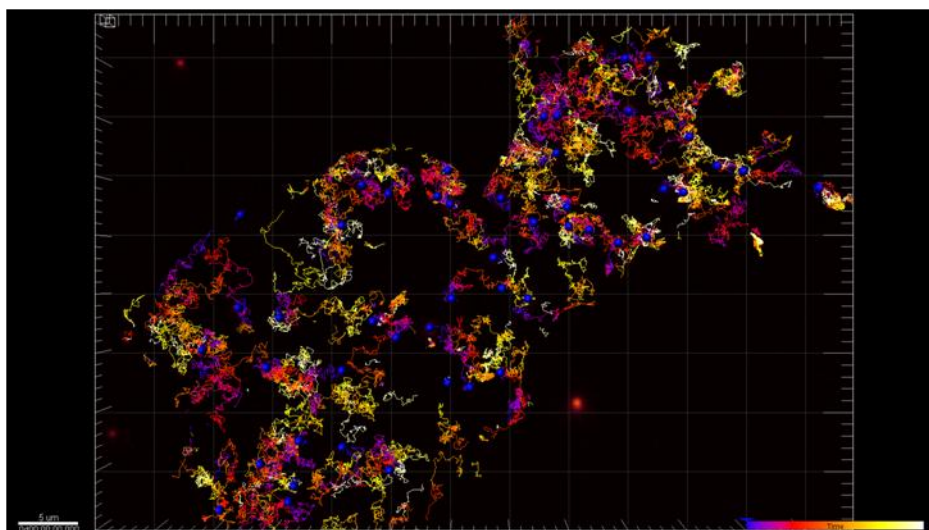


**Figura 1.6. Principio di funzionamento del microscopio TIRF.** Il raggio laser collimato incide sull'interfaccia vetro-acqua e forma un angolo di riflessione totale con questa. Un'onda evanescente penetra comunque nel campione e consente l'eccitazione di molecole di fluoro foro vicine all'interfaccia. In figura vengono anche riportati i coefficienti di rifrazione rispettivi del vetro ( $n=1.508$ ) e dell'acqua ( $n=1.33$  in acqua pura- $1.37$  in soluzioni dense come il citoplasma).

### 1.4.1. Analisi di *Single Particle Tracking*

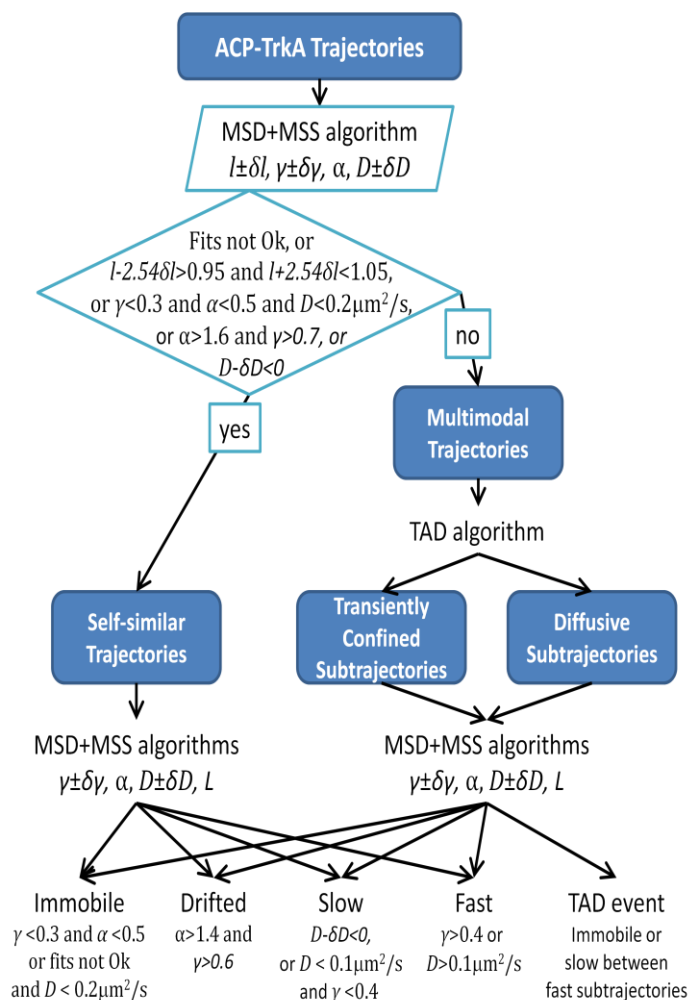
In caso di misure destinate ad analisi a singola molecola, i filmati ricavati tramite tecniche di microscopia simili a quelle sopra descritte, vengono poi analizzati solitamente in modo automatico o semiautomatico utilizzando algoritmi di tracciatura di singole particelle (SPT). Nel caso in cui ci sia, nel campo di vista dei filmati sopra menzionati, una densità di particelle marcata corretta per un'analisi a singola molecola, queste si presentano come una serie di spot fluorescenti in movimento all'interno di un'area specifica, ad esempio la membrana plasmatica a livello dell'interfaccia d'acquisizione; la durata dei fotogrammi può arrivare all'ordine dei ms o addirittura dei  $\mu$ s. Il primo passo di un'analisi SPT consiste nell'identificazione in ogni singolo fotogramma di spot fluorescenti che possano corrispondere a singole molecole (massimi locali di intensità corrispondenti a zone fluorescenti che abbiano, ad esempio, un'intensità integrata ed una dimensione ritenute comparabili con quelle di una singola

molecola del fluoroforo nel piano di visualizzazione del campione); il secondo passaggio consiste nella localizzazione delle molecole, che può essere determinata assegnando come posizione della molecola il centroide della spot visualizzato in microscopia o il centro di una gaussiana bidimensionale utilizzata per modellarla (procedura di *fitting*), garantendo in tal modo una misura più precisa del limite di diffrazione del microscopio usato. Questo processo viene effettuato per ogni fotogramma del filmato: successivamente i punti che possono essere associati alla stessa molecola in più fotogrammi diversi, vengono connessi tra di loro allo scopo di formare le traiettorie. Esistono diversi tipi di algoritmo di calcolo per ottimizzare la creazione di tali traiettorie ma una trattazione di questi va oltre gli scopi di questa tesi, dove abbiamo utilizzato direttamente l'implementazione contenuta nel *software Imaris* per particelle con moto Browniano. Ogni traiettoria consiste in una sequenza di posizioni (lungo gli assi x e y) della particella ed eventualmente di intensità di fluorescenza associata in funzione del numero del fotogramma in cui tale particella è rilevata.



**Figura 1.7. Rappresentazione delle traiettorie di recettore marcato, in movimento sulla membrana basale di cellule vive, ottenute mediante la tecnica SPT.** In figura viene illustrato il risultato relativo all'analisi SPT ottenuto mediante il *software Imaris*; sono mostrate le traiettorie compiute dai recettori nei 3000 fotogrammi e i diversi colori sono associati al differente istante di tempo nella traiettoria, come indicato dalla barra colorimetrica presente in basso a destra. Barra di scala di 5  $\mu\text{m}$ .

Le traiettorie così ottenute possono essere sottoposte ad ulteriori passaggi di analisi per ottenere dei parametri che descrivano una statistica dei movimenti delle particelle di interesse. Nel lavoro di Marchetti et al. (Marchetti L. et al., 2013), i cui metodi sono stati riutilizzati in questo lavoro di tesi, l'analisi viene portata avanti mediante un codice scritto utilizzando il programma *Matlab* che attraverso un processo articolato in più passaggi riesce a discriminare sia i tipi di moto tipici di una molecola sia i parametri quantitativi che ne caratterizzano l'andamento dinamico.



**Figura 1.8. Rappresentazione schematica dell'analisi delle traiettorie operata da *Matlab* su singoli recettori ACP-TrkA marcati con QDot.**  $D$  in questa figura corrisponde in realtà a  $D_{12}$ ,  $l$  è il coefficiente della retta che meglio approssima i valori di  $\gamma_v$  in funzione di  $v$  in un grafico bi logaritmico (immagine adattata da Marchetti L. et al., 2013). Gli altri parametri sono definiti nel testo.

Esempi di moto che caratterizzano le traiettorie di particelle in movimento in membrana sono il moto Browniano, quello confinato e quello direzionato (*drifted*). Le

molecole che si muovono di moto Browniano presentano un'andamento isotropico, disordinato, tipico dei moti diffusivi; le molecole caratterizzate da un moto di tipo confinato si muovono solo all'interno di un'area ristretta della membrana; infine le particelle caratterizzate da moto di tipo direzionato presentano una componente a velocità costante. Oltre a informazioni relative al tipo di moto delle molecole, dagli studi di SPT è possibile ricavare parametri quantitativi relativi alla dinamica della molecola, come ad esempio il coefficiente di diffusività ( $D$ ), l'area di confinamento ( $L$ ), la velocità della componente di movimento ( $V$ ). La maggior parte di questi parametri vengono ottenuti attraverso il calcolo dello spostamento quadratico medio in funzione dell'intervallo di tempo trascorso (*Mean Square Displacement* – MSD, Equazione 1.1).

$$MSD(n\tau) = \frac{1}{N-n} \cdot \sum_{i=1}^{N-n} [(x((i+n)\tau) - x(i\tau))^2 + (y(i+n)\tau) - y(i\tau))^2]$$

**Equazione 1.1: Equazione per il calcolo della funzione MSD.**  $N$  indica il numero totale di fotogrammi;  $n$  la differenza fra il numero di fotogrammi,  $\tau$ , l'intervallo tra un fotogramma ed il successivo;  $n\tau$  l'intervallo di tempo per il quale l'MSD viene calcolata mentre  $x(t)$  e  $y(t)$  rappresentano le coordinate spaziali in funzione del tempo.

Le categorie di moto sopra citato presentano un andamento della MSD che può essere modellizzato matematicamente tramite specifiche funzioni, come sotto descritto, ricavandone perciò i parametri quantitativi sopra citati.

- Per quanto riguarda il moto *Browniano* lo spostamento quadratico medio risulta direttamente proporzionale al tempo, per cui si potrà fittare l'MSD mediante l'equazione seguente:

$$MSD(n\tau) = 4Dn\tau + 4\sigma^2$$

**Equazione 1.2: Funzione di fit di MSD per un moto *Browniano*.** In tale equazione  $D$  sta ad indicare il coefficiente di diffusione; il termine additivo  $4\sigma^2$ , presente anche nelle equazioni precedenti, tiene conto dell'impatto dell' "errore incertezza media nella localizzazione della molecola"  $\sigma$ .

- Per quanto riguarda invece il moto direzionato, l'MSD contiene un termine quadratico aggiuntivo, dato che nella componente direzionale lo spostamento è direttamente proporzionale al tempo:

$$MSD(n\tau) = 4Dn\tau + (Vn\tau)^2 + 4\sigma^2$$

**Equazione 1.3: Funzione di fit di MSD per un moto direzionato.** In tale equazione  $D$  è il coefficiente di diffusione,  $\sigma$  l'errore di localizzazione della molecola,  $V$  la velocità di deriva (*drift*).

- Per quanto riguarda un movimento di tipo confinato, l'MSD crescerà fino a raggiungere asintoticamente un limite massimo, come accade nella seguente funzione con cui l'MSD può essere approssimabile:

$$MSD(n\tau) = \frac{L^2}{3} \left[ 1 - e^{-12Dn\tau/L^2} \right] + 4\sigma^2$$

**Equazione 1.4: Possibile funzione di fit di MSD per un moto confinato.** Qui, oltre a  $D$  e  $\sigma$ , compare la dimensione lineare tipica dell'area di confinamento ( $L$ ). Tale equazione descrive una particella che si muove con moto diffusivo descritto dal coefficiente  $D$  ma solo all'interno di un'area ristretta, individuata dal parametro  $L$ .

L'utilizzo delle precedenti equazioni, pur essendo molto descrittivo, è poco adatto per analizzare un alto numero di traiettorie in maniera semiautomatica. Risulta più conveniente, in certi casi, utilizzare dei parametri quantitativi che possano descrivere una determinata traiettoria indipendentemente dal tipo di moto della particella che la segue. Un primo parametro è il coefficiente di diffusione medio su brevi intervalli  $D_{12}$ , ottenuto, considerando la retta di equazione 1.1 passante per i primi due punti dell'MSD. Un altro parametro utilizzato spesso è il parametro di diffusione anomala  $\alpha$ , ottenuto modellizzando la MSD utilizzando la seguente funzione di fit:

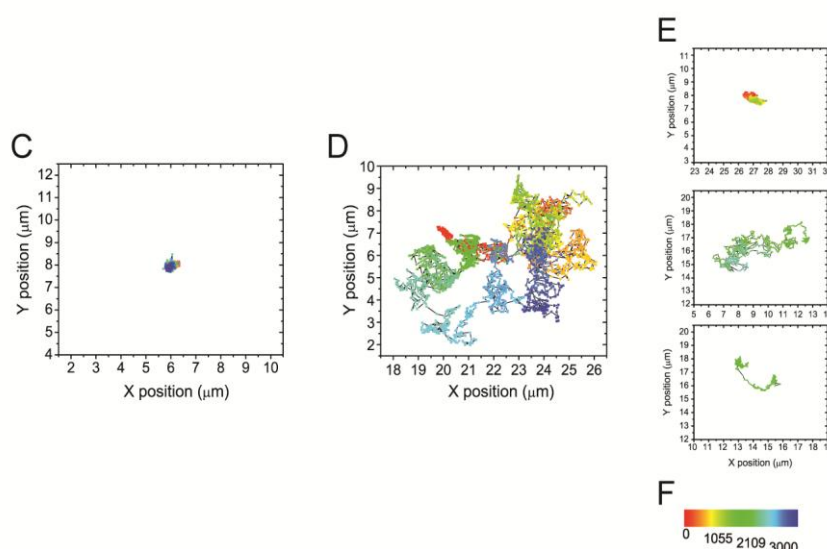
$$MSD(n\tau) = 4\sigma^2 + 4k \cdot (n\tau)^\alpha$$



**Equazione 1.5: funzione di modellizzazione di MSD per diffusione anomala.**  $k$  è chiamato anche coefficiente di diffusione generalizzato,  $\alpha$  è il parametro di diffusione anomala,  $\sigma$  l'errore di localizzazione della molecola.

Per moti di tipo Browniano  $\alpha$  sarà vicino ad 1, mentre sarà minore di 1 per moti sub-diffusivi (ad esempio, confinati), e sarà maggiore di 1 per moti superdiffusivi (ad esempio, direzionati).

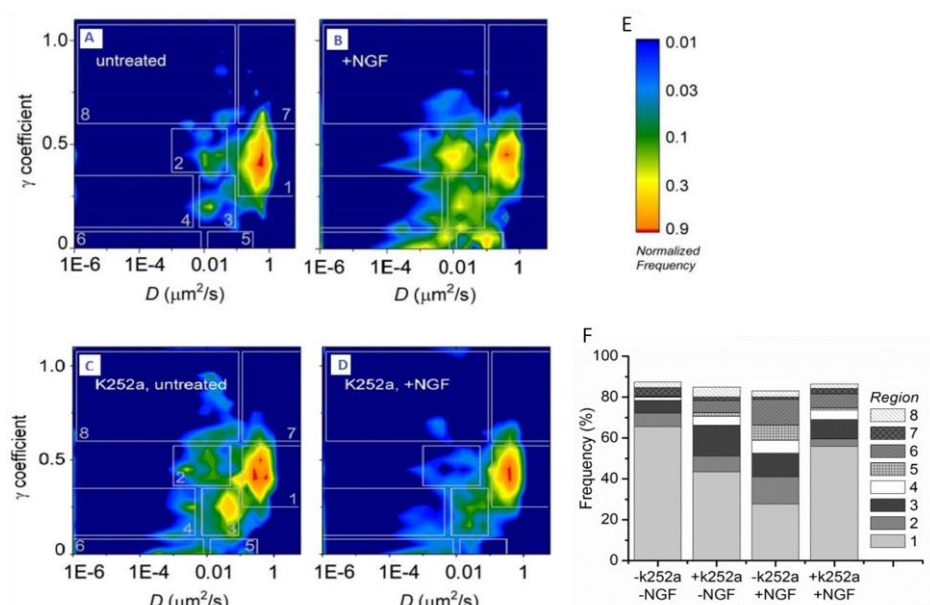
Non sempre è possibile riuscire a definire il tipo di moto che caratterizza una traiettoria attraverso il solo calcolo dell'MSD, specialmente se la traiettoria è caratterizzata dalla combinazione o dalla sequenza di diversi tipi di moto (traiettoria multimodale). Per tale motivo viene adottato un altro tipo di analisi, basata sull'algoritmo MSS (*Moment Scaling Spectrum*) che, fra l'altro, risulta un metodo più robusto per calcolare un diverso coefficiente di diffusione anomala  $\gamma$ . Per ottenere un'analisi MSS, per ogni traiettoria vengono calcolati i momenti  $\mu_\nu(t)$  di ordine  $\nu$  (solitamente compreso tra i valori 1 e 6) in funzione dell'intervallo di tempo (il momento  $\mu_2(t)$  corrisponde all' MSD); i diversi momenti vengono poi fittati con l'equazione  $\mu_\nu(t) = \eta_\nu \sigma^\nu + 4D_\nu \cdot t^{\gamma_\nu}$ . Se riportando su un grafico il coefficiente  $\gamma_\nu$  in funzione dell'ordine del momento  $\nu$ , otteniamo una serie di punti che si trovano sulla stessa retta passante per l'origine, allora la traiettoria ottenuta corrisponderà quasi sicuramente ad una traiettoria caratterizzata da un solo tipo di moto (monomodale). Il coefficiente angolare di questa retta è chiamato  $\gamma$  ed ha valori vicini a 0.5 per moti Browniani, inferiori per moti sub-diffusivi (confinati) e superiori per moti superdiffusivi (direzionati); come si può vedere, il parametro  $\gamma$  è legato a  $\alpha/2$  (i due valori tendono ad essere gli stessi in caso di traiettorie veramente monomodali molto lunghe). Al contrario quando non c'è una chiara relazione di proporzionalità diretta fra  $\gamma_\nu$  e  $\nu$ , allora la traiettoria sarà molto probabilmente di tipo multimodale. Nell'analisi utilizzata in questa tesi (Marchetti L. et al., 2013), tali traiettorie vengono eventualmente suddivise in sottotraiettorie "diffusive" e in zone di confinamento transiente utilizzando un metodo chiamato TAD (*Transient Arrest of Diffusion*), che dall'analisi dell'andamento temporale della diffusività istantanea considera la verosimiglianza che un tratto della traiettoria non sia casualmente confinato. Esempi di traiettorie che seguono i tipi di moto sopra descritti sono riportati in figura 1.9.



**Figura 1.9. Illustrazione dei differenti tipi di moto delle traiettorie.** C) Traiettoria immobile; D) traiettoria multimodale; E) differenti modalità di dinamica che caratterizzano le traiettorie multimodali: lente o confinate (in alto), diffusive o veloci (in mezzo), superdiffusive o direzionate. F) Scala cromatica del numero di fotogramma per ciascuno spot della traiettoria (immagine tratta da Marchetti L. et al., 2013).

Un metodo grafico che offre una visualizzazione chiara dei risultati ottenuti da questa analisi SPT si basa su mappe di distribuzione di probabilità che correlano in ordinata  $\gamma$ , in ascissa  $D_{12}$  e sull'asse delle  $z$  l'intensità di densità di probabilità con cui sperimentalmente si sono trovati i valori di questi parametri, espressa in scala colorimetrica (Vedi gli esempi in Figura 1.10 A-D; nel prossimo capitolo verranno descritti gli esperimenti che hanno portato a tali risultati). Nell'implementazione utilizzata in questa tesi (Marchetti L. et al., 2013) tali mappe sono ottenute dalla somma di distribuzioni gaussiane bidimensionali centrate sui valori calcolati di  $\gamma$  e  $D_{12}$  per ogni traiettoria, aventi come deviazione standard le incertezze ricavate per i due parametri e pesate per il numero di punti che la compongono. Bisogna porre attenzione al fatto che nella rappresentazione grafica di tali distribuzioni (all'interno di questa tesi) viene utilizzata una scala di colore "logaritmica" in cui il massimo della distribuzione corrisponde al colore più caldo, come se la distribuzione fosse normalizzata ad uno sul picco (Figura 1.10 F); questo consente una visualizzazione migliore delle differenze tra le distribuzioni ed in particolare, permette di apprezzare differenze in aree che corrispondono a moti importanti ma meno rappresentati. Un confronto più quantitativo si può ottenere confrontando le probabilità con cui si sono trovati i valori combinati di  $\gamma$  e

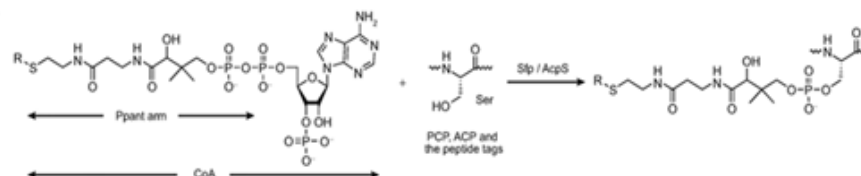
$D_{12}$  all'interno di intervalli più grandi, rappresentanti un determinato tipo di moto, quali ad esempio quelli mostrati dalle regioni segnate nei pannelli di Figura 1.10A-D e numerate nel pannello di Figura 1.10A. Tali valori sono ottenuti dagli integrali all'interno di tali regioni della distribuzione sperimentale normalizzata ad 1 calcolata come sopra descritto, e sono riportati in percentuale negli istogrammi a barre sovrapposte del pannello di Figura 1.10F.



**1.10. Descrizione della motilità di membrana di TrkA in presenza e assenza di NGF e dell'inibitore K252a.** Vengono illustrate le distribuzioni sperimentali per i parametri  $D_{12}$  ( $D$ ) e  $\gamma$  ( $\gamma$  coefficient) trovati per: A) TrkA in assenza di NGF; B) TrkA in presenza di NGF; C) TrkA in assenza di NGF e di inibitore dell'attività chinasi K252a; D) TrkA in presenza di NGF e di inibitore dell'attività chinasi K252a. E) La barra cromatica laterale, che varia da un valore massimo (indicato dal colore rosso) ad un minimo (indicato dal colore blu), indica la frequenza relativa con cui si sono trovati i parametri delle traiettorie. Le regioni numerate da 1 a 8 nel pannello A, corrispondono a differenti tipi di moto del recettore sulla membrana ritenuti interessanti (immagine adattata da Marchetti L. et al., 2013). In F) sono riportate, in percentuale, le probabilità relative con cui si sono trovati i parametri  $D_{12}$  e  $\gamma$  all'interno di tali regioni.

## 1.5. Studi di *imaging* a singola molecola del recettore TrkA: stato dell'arte.

Studi di SMI e SPT sono stati recentemente condotti presso i laboratori NEST per descrivere la diffusività in membrana dei recettori neurotrofinici, in particolare del recettore TrkA, sia in presenza che assenza di NGF; tali studi sono stati condotti in diverse linee cellulari quali CHO, PC12 nnr5 e SH-SY5Y (Callegari A. et al., 2012, Marchetti L. et al., 2013, Marchetti L. et al., 2014; Marchetti L. et al., 2015). La strategia sperimentale utilizzata ha previsto la fusione del dominio ECD del recettore TrkA di ratto con il tag *Acyl Carrier Protein* (ACP); ciò ha consentito una marcatura selettiva della popolazione di recettore presente in membrana e, attraverso una successiva analisi con microscopia ad epifluorescenza in campo largo e/o TIRFm, di indagarne le dinamiche a livello di membrana (Callegari A. et al., 2012; Marchetti L. et al., 2013). L'ACP-tag funge da substrato per l'azione di enzimi Fosfopanteteiniltrasferasi (*Phosphopantetheinyltransferases*, PPTasi); le PPTasi riconoscono specificamente il co-substrato Coenzima-A (CoA), tagliano il braccio fosfopanteteinico del CoA e lo legano covalentemente al gruppo OH di un residuo di serina conservato dell'ACP, mediante legame fosfodiester. Sul braccio fosfopanteteinico possono essere coniugate molecole come la biotina, che sfruttando l'affinità biotina-streptavidina possono consentire la marcatura selettiva dei recettori biotinilati aggiungendo QDot streptavidinati al terreno di coltura delle cellule. CoA e PPTasi non permeano nella membrana plasmatica e ciò consente di osservare effettivamente solo il gruppo di recettori localizzato in membrana, almeno in una finestra temporale vicina alla marcatura (a tempi lunghi infatti il recettore marcato potrà essere internalizzato).



**Figura 1.11. Meccanismo d'azione delle PPTasi.** Le PPTasi tagliano il braccio fosfopanteteinico del Coenzima-A e catalizzano il suo trasferimento su un residuo di OH della serina di specifici substrati quali PCP, ACP e altri derivati. Il legame di tale braccio ai substrati consente la coniugazione con gruppi R (come la biotina), alla quale possono essere legati QDot streptavidinati oppure direttamente altri fluorofori, in grado di marcare selettivamente i recettori.

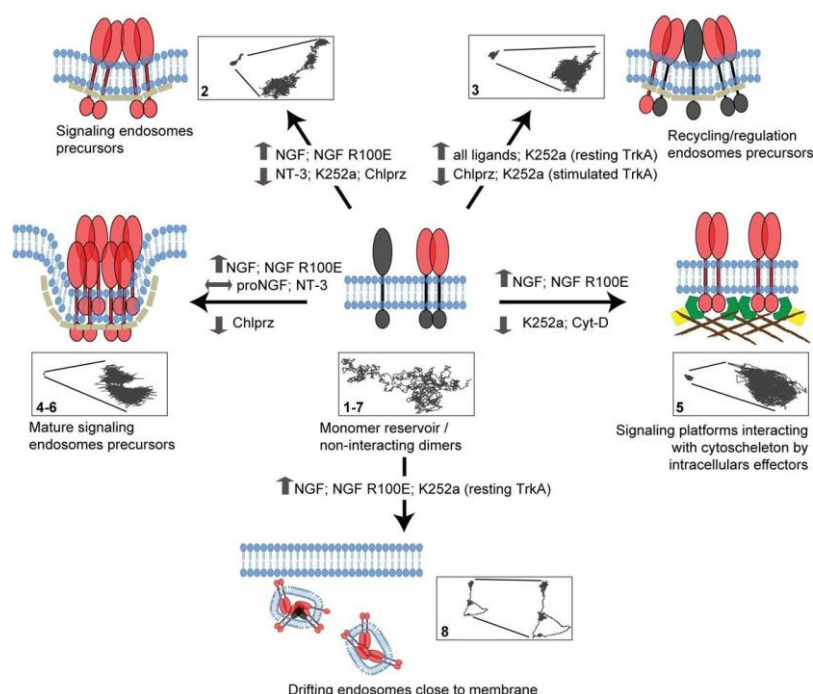
I primi risultati dell'analisi SPT in cellule PC12 differenziate (Callegari A. et al., 2012) hanno evidenziato un comportamento diffusivo di ACP-TrkA di tipo eterogeneo, in quanto caratterizzato da 3 tipi di moto, talvolta successivi all'interno di una stessa traiettoria: Browniano, confinato e direzionato. Inoltre è stato anche osservato come la proporzione dei differenti tipi di moto vari anche a seconda che il recettore sia localizzato nei neuriti o nel soma; a livello del soma la percentuale di recettori caratterizzati da un moto di tipo confinato sembrerebbe essere maggiore di quella osservata nei neuriti. In un lavoro successivo (Marchetti L. et al., 2013), sfruttando la medesima strategia di marcatura ed utilizzando la linea cellulare immortale SHSY-5Y, sono stati caratterizzati i profili di diffusività di TrkA in presenza e assenza di NGF (e/o di altri ligandi della famiglia di NT), e anche in presenza dell'inibitore dell'attività chinastica K252a. Alcuni risultati significativi sono riportati in Figura 1.10; tali grafici (mappe di distribuzione  $D-\gamma$ ) riportano in ascissa il coefficiente di diffusività  $D$  e in ordinata il coefficiente  $\gamma$  (sempre positivo), indice del tipo di moto osservato dalle molecole: un coefficiente  $\gamma$  vicino a valori di 0.5 corrisponde a molecole caratterizzate da moto Browniano, valori inferiori a molecole che hanno un moto di tipo confinato e valori maggiori ad un moto della molecola di tipo direzionato.

Alle differenti aree individuate sulla mappa, indicate con numeri che vanno da 1 a 8, sono state speculativamente attribuite differenti movimenti del recettore; inoltre, in seguito ad esperimenti con vari ligandi e varie droghe, le quali influenzano diverse funzioni cellulari, sono state ipotizzate le condizioni biologiche in cui si troverebbero i recettori rappresentati nelle diverse regioni e le eventuali strutture ad esso associate che ne influenzano la dinamica. Come visibile dalla Figura 1.12 le differenti aree individuate offrono una panoramica molto variegata (Marchetti L. et al., 2013):

- Area 1: caratterizzata da traiettorie veloci e diffusive all'interno di una regione di confinamento relativamente grande; tale area sembrerebbe rappresentare una

riserva di recettori in forma monomerica, in attesa del legame con il ligando oppure, in seguito al legame col ligando, anche forme dimeriche che ancora non si sono legate ad effettori interni alla cellula o non si sono localizzate in zone di pre-endocitosi.

- Area 2: caratterizzata da traiettorie con un basso grado di confinamento e un minore coefficiente di diffusività; tale regione viene popolata in seguito al legame con il ligando. Sembrerebbe che a questo livello i recettori si trovino a livello di precursori di endosomi segnale.
- Area 3: caratterizzata da traiettorie con alto grado di confinamento ma con un coefficiente di diffusione leggermente più alto di quello riscontrato nella regione 2; in quest'area i recettori sono presenti a livello di precursori di endosomi di riciclo, di internalizzazione o degradazione.
- Aree 4 e 6: caratterizzate dalle traiettorie più lente e con coefficiente  $\gamma$  molto basso che sta ad indicare che i recettori sono pressoché immobili; qui sono presenti molto probabilmente i recettori a livello di precursori di endosomi segnale maturi.
- Area 5: caratterizzata da traiettorie confinate e con un coefficiente di diffusione a tempi brevi relativamente alto; tale regione viene popolata in seguito ai processi di fosforilazione indotti da ligando, per cui si è ipotizzato che i recettori a questo livello siano coinvolti in piattaforme di segnalazione in cui vi è interazione con il citoscheletro e gli effettori intracellulari;
- Aree 7 e 8: caratterizzate da traiettorie di tipo direzionato che possono essere veloci, nel caso dell'area 7, e lente nel caso dell'area 8. In queste aree i recettori si trovano all'interno di endosomi internalizzati in membrana. All'interno dell'area 7 è presente anche la coda di distribuzioni corrispondenti a traiettorie caratterizzanti l'area 1.

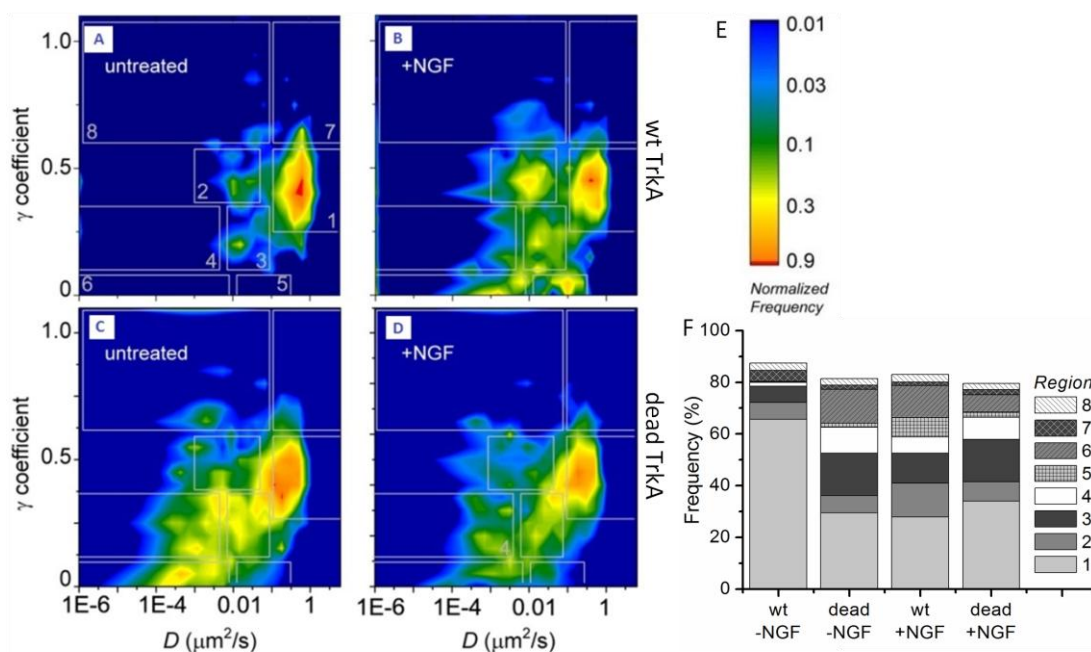


**Figura 1.12. Rappresentazione grafica delle aree di popolazioni recettoriali presenti a livello della membrana (immagine tratta da Marchetti L. et al., 2013).**

Nel lavoro sopra citato sono state ricavate diverse informazioni: profili di diffusività riportati in Figura 1.10 e la distribuzione delle intensità degli spot relativi al recettore TrkA quando marcato con fluorofori organici. I risultati hanno evidenziato come gran parte della popolazione recettoriale, in assenza di NGF, sia caratterizzata da recettori in forma monomerica che si muovono molto velocemente, con un coefficiente di diffusività medio di  $0.7 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , caratterizzati da un valore di  $\gamma$  che si avvicina allo 0.5 (indice di un moto Browniano); ciò nonostante sono popolate anche aree caratterizzate da coefficienti di diffusione minore che derivano dalla presenza di recettori sia in forma monomerica che di/oligomerica. In seguito all'aggiunta di NGF, il recettore rallenta e in particolar modo, (come si può osservare dalla mappa e dagli istogrammi cumulativi a barre riportati in Figura 1.10) aumentano le popolazioni di recettori immobili, diminuisce la frequenza di recettori che si muovono con alto coefficiente di diffusività, aumenta il numero delle traiettorie confinate che si è visto correlare con l'insorgere di *clusters* di recettori. L'effetto dell'inibitore K252a sul recettore, in condizioni di assenza di ligando, induce un profilo di diffusività simile a quello ottenuto per il recettore TrkA in presenza di NGF con la differenza che vi è un'aumento del numero di traiettorie confinate caratterizzate da un coefficiente di diffusività  $D$  relativamente alto, a livello della regione 3 ed una mancata diminuzione dei recettori veloci ma molto confinati (regione 5). La

somministrazione di NGF al recettore pretrattato con inibitore K252a, sembra invece mostrare un'inversione di comportamento rispetto al caso precedente, in quanto aumentano le popolazioni di recettori che si muovono con un alto coefficiente di diffusività.

Allo scopo di comprendere la correlazione esistente tra la tipologia di moto a livello della membrana e la diversa risposta biologica indotta è stato generato un mutante *dead-kinase* del recettore TrkA, caratterizzato dalla mutazione K547N, che prevede la conversione di un residuo di lisina in uno di asparagina. L'effetto indotto da tale mutante è quello di andare a bloccare il sito di legame per l'ATP adiacente al labbro di fosforilazione, a livello del dominio ICD (Jullien J. Et al., 2002). Tale mutante infatti, in seguito al legame con NGF, può dimerizzare ma non indurre i processi di trans-fosforilazione e di attivazione di effettori intracellulari a valle. Studi di SMI e SPT sono stati effettuati anche a livello di tale mutante e hanno evidenziato i risultati rappresentati in Figura 1.13.



**Figura 1.13. Caratterizzazione della mobilità di membrana del recettore TrkA wt e della forma mutante *dead-kinase* (dead).** Distribuzioni di  $D_{12}$  e  $\gamma$  per: A) TrkA wt in assenza di NGF; B) TrkA wt in presenza di NGF; C) mutante *dead-kinase* in assenza di NGF; D) mutante *dead-kinase* in presenza di NGF. E) scala colorimetrica per i pannelli A-D; F) probabilità percentuale per i parametri  $D_{12}$  e  $\gamma$  all'interno delle regioni numerate nel pannello A.



Il mutante *dead-kinase* si comporta in maniera simile al caso del Trka *wt* in presenza di K252a; anche tale mutante, in assenza di NGF, mostra inaspettatamente un profilo dinamico paragonabile a quello di TrkA *wt* trattato con NGF, caratterizzato dal grosso aumento di recettori che si muovono a basso coefficiente di diffusività e recettori aventi traiettorie confinate. Un'ipotesi preliminare per tale comportamento inaspettato potrebbe essere che i recettori che non possono legare l'ATP vengano bloccati a livello di precursori di vescicole di internalizzazione, con modalità però ancora non note. L'aggiunta di NGF sul mutante *dead-kinase* sembra "velocizzare" leggermente il recettore, anche se in maniera meno marcata rispetto al caso del TrkA *wt* trattato con K252a, come se il recettore in presenza di ligando provasse a tornare attivo.

## 2. Scopo della tesi

Il presente lavoro di tesi si inserisce all'interno di una linea di ricerca che si propone di correlare la dinamica di membrana del recettore TrkA alla sua attività funzionale. Nel dettaglio, la mia attività ha lo scopo di capire le basi molecolari dell'anomalo comportamento diffusivo in membrana osservato per il mutante TrkA *dead-kinase*. L'approccio sperimentale scelto per questa indagine è così articolato:

- i) creazione di costrutti ricombinanti mutanti a partire dal template ACP-TrkA *wt* (Callegari et al, 2012): mediante protocolli di mutagenesi sito-specifica, sono stati preparati dei mutanti recanti mutazioni a livello di uno o più residui di tirosina dell'ICD del recettore; il pannello di mutanti così generato consentirà di dissezionare le varie funzionalità ascrivibili a singole o a singoli gruppi di tirosine fosforilate, che sono invece ricapitolate nel mutante *dead-kinase*, perché tale mutante non può essere fosforilato in nessuna delle sue tirosine;
- ii) validazione dei costrutti mutanti generati: sono usati diversi approcci per valutare la bontà dei costrutti preparati. Innanzitutto, il DNA ricombinante che li codifica è stato sequenziato per verificare l'effettivo inserimento delle mutazioni desiderate; inoltre, attraverso un'analisi di Western Blot è stato verificato che i costrutti non siano andati incontro a fenomeni degradativi quando espressi nelle cellule. Infine, mediante marcatura "*bulk*" dei recettori mutati espressi in cellule vive è stata fatta un'analisi in microscopia confocale per verificare che essi siano espressi correttamente nella membrana plasmatica, con livelli paragonabili a quelli dei rispettivi costrutti *wt* e *dead-kinase*, già disponibili in laboratorio.
- iii) acquisizione e analisi di SPT dei mutanti simultaneamente ai rispettivi costrutti *wt* e *dead-kinase*: i costrutti di interesse sono stati espressi in cellule vive; dopo marcatura per *SMI* del pool di recettore espresso sulla membrana plasmatica, i movimenti di singole molecole di recettore sono stati seguiti nel tempo mediante microscopia TIRF; i filmati ottenuti sono stati processati per consentire una descrizione quantitativa della dinamica a singola molecola dei costrutti mutati e un paragone con l'analogo ottenuto per *wt* e *dead-kinase*.

## 3.Materiali e metodi

### 3.1. Generazione dei mutanti di ACP-TrkA

In questa sezione vengono illustrati gli esperimenti di mutagenesi sito-specifica finalizzati alla costruzione di mutanti puntiformi di ACP-TrkA, ottenuti mediante la conversione di un residuo di tirosina in uno di fenilalanina. I mutanti singoli considerati sono stati i seguenti: Y499F,Y679F,Y683F,Y684F, Y760F,Y794F, Y704F mentre i mutanti combinati sono stati: Y499F/Y760F, Y499F/Y760F/Y794F (*Recruitment-Mutant*) e Y679F/Y683/Y684F (*Kinase-Mutant*).

#### 3.1.1. Disegno dei primers

In prima analisi sono stati disegnati i primers per la mutagenesi secondo i seguenti prerequisiti:

- entrambi i primers devono contenere la mutazione desiderata e appaiarsi alla stessa sequenza ma su filamenti opposti del plasmide;
- la mutazione desiderata deve trovarsi all'incirca al centro della sequenza dei primers;
- il contenuto in GC dei primer non deve essere superiore al 40%;
- entrambi i primers devono avere una lunghezza compresa tra le 25-40 bp, con una temperatura di melting ( $T_m$ ) maggiore di 78°C. Per stimare la temperatura di melting dei primers viene applicata la seguente formula:

$$T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

**Equazione 3.1. Equazione per la temperatura di melting (T<sub>m</sub>).** N è la lunghezza in bp del primer; %GC è il contenuto in percentuale di basi citosina-guanina; % mismatch è il contenuto, in percentuale, di basi non appaiate alla sequenza *target*.

Le sequenze dei primers disegnati per ottenere i mutanti singoli sono di seguito riportate in tabella:

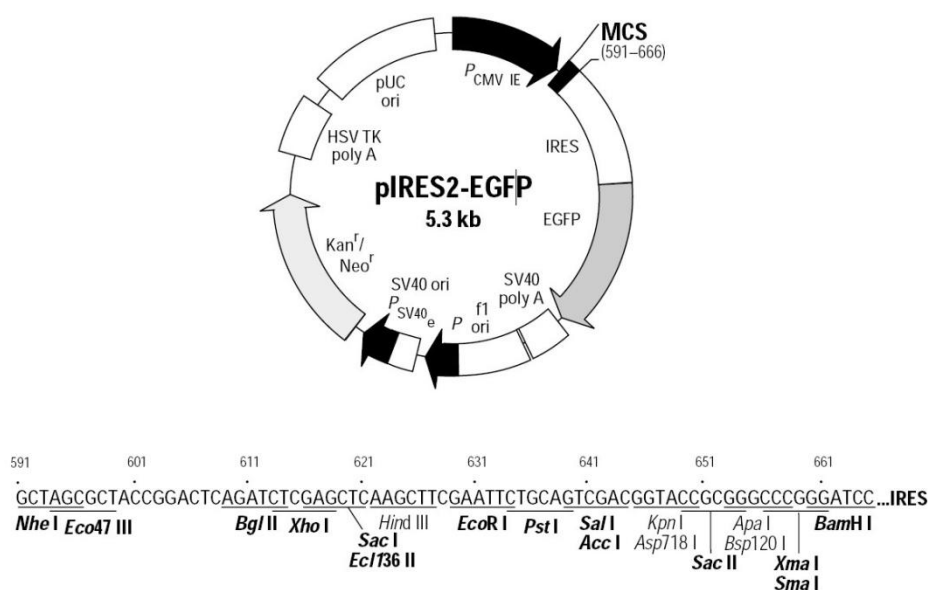
<b><i>Mutanti</i></b>	<b>SEQUENZA PRIMER FORWARD (5'-3')</b>	<b>SEQUENZA PRIMERS REVERSE (3'-5')</b>
<b><i>Y499F</i></b>	GGAGAACCCACAGTTCTTCA GTGATACCTGTGTC	GACACAGGTATCACTGAAG AACTGTGGGTTCTCC
<b><i>Y679F</i></b>	CATGAGCAGGGACATCTTCA GCACAGACTACTACC	GGTAGTAGTCTGTGCTGAA GATGTGCTGTAGATG
<b><i>Y683F</i></b>	CATCTACAGCACAGACTTCTA CCGTGTGGGAGGTC	GACCTCCCACACGGTAGAA GTCTGTGCTGTAGATG
<b><i>Y684F</i></b>	CTACAGCACAGACTACTTCC GTGTGGGAGGTCGG	CCGACCTCCCACACGGAAG TAGTCTGTGCTGTA
<b><i>Y760F</i></b>	CTGCCCTCCTGATGTCTTCG CCATCATCATGCGCGGC	GCCGCGCATGATGGCGAAG ACATCAGGAGGGCAG
<b><i>Y794F</i></b>	CAGGCGCCACCGAGTTTCCT GGACGTTCTGGGC	GCCCAGAACGTCCAGGAAA CTCGGTGGCGCCTG
<b><i>Y704F</i></b>	GAGAGCATCCTCTCCCGCAA GTTTCAG	CTGAACTTGCGGGAGAGGA TGCTCTC

**Tabella 3.1** Tabella relativa alle sequenze dei primers utilizzati per ottenere i mutanti singoli.

### 3.1.2. Reazione di mutagenesi

La mutagenesi sito-specifica è stata effettuata utilizzando il kit *Stratagene's QuikChange® Site-Directed Mutagenesis*.

Il template di partenza è il cDNA di ACP-TrkA, ottenuto dal cDNA di TrkA di ratto a cui è stata geneticamente fusa la sequenza dell'ACP (acyl carrier protein) tra la regione codificante per il peptide segnale e quella codificante per il resto della proteina, in modo tale da potervi coniugare covalentemente fluorofori o altre molecole quali la biotina (Callegari A. et al., 2012). Tale costrutto è stato clonato all'interno del plasmide pIRES2-eGFP (*Clontech*), un vettore di espressione in cellule di mammifero, le cui caratteristiche principali vengono mostrate in Figura 3.1.



**Figura 3.1. Rappresentazione schematica del plasmide pIRES2-EGFP.** Promotore-CMV; marcatore di selezione-neomicina; la resistenza batterica-kanamicina; tag-IRES-eGFP.

Prima di effettuare la reazione di PCR, si procede con le opportune diluizioni dei primers e dei template da mutagenizzare. I reagenti utilizzati per la reazione di PCR

sono quelli del kit *Stratagene's QuikChange® Site-Directed Mutagenesis*. Qui di seguito viene riportata la mix di reazione per la PCR, per un volume finale di 50 µl:

- 31.5 µl di H<sub>2</sub>O DEPC
- 7.5 µl di *reaction buffer* (10X)
- 3 µl di *quick solution*
- 2.5 µl (125 ng) di oligonucleotide primer FW
- 2.5 µl (125 ng) di oligonucleotide primer RV
- 1µl di dNTP mix
- 1µl (5–50 ng) di template di dsDNA
- 1µl di Turbo DNA polimerasi (2.5 U/µl).

La Turbo DNA Polimerasi deve essere mantenuta sempre in un apposito contenitore refrigerante in grado di mantenere una temperatura di -20°C anche fuori dal freezer, per evitare processi di denaturazione indotti da calore e deve essere aggiunta alla mix di reazione appena prima che questa venga inserita all'interno del termocicizzatore.

Il programma da impostare al termocicizzatore è il seguente:

- denaturazione iniziale 1 minuto a 95°C
- 18 cicli di:
  - denaturazione 50 secondi a 95°C
  - annealing 50 secondi a 60°C
  - estensione 8 minuti a 68°C
- estensione finale 8 minuti a 68 °C.

Il ciclo d'estensione prevede la durata di 1 minuto per ogni kilobase (kb) di template, nel caso specifico si adotta un tempo di estensione di 8 minuti in quanto l'intero costrutto in cui è inserito il template di ACP-TrkA ha una lunghezza complessiva di 7.8 Kb.

Allo scopo di andare a separare i frammenti di DNA ottenuti mediante l'amplificazione per PCR viene effettuata una corsa elettroforetica su gel d'agarosio. Per preparare il gel per elettroforesi bisogna sciogliere una polvere di agarosio (*Eppendorf*) in *Tris-borato-EDTA TBE (Bio-Rad)*, che è un buffer contenente EDTA. L'EDTA è un agente chelante cationi bivalenti che è in grado di inibire l'azione delle nucleasi e della DNA ligasi, dato

che queste possono causare problemi nelle reazioni successive di purificazione o ligazione del DNA. La soluzione preparata viene portata ad ebollizione. Successivamente viene aggiunto Bromuro d'etidio concentrato 0.5 µg/ml, un agente chimico che aumenta considerevolmente la sua fluorescenza quando si intercala tra le basi degli acidi nucleici, permettendo di monitorare la migrazione del DNA o RNA all'interno del gel. A questo punto la soluzione ottenuta viene fatta polimerizzare sotto cappa chimica in camere elettroforetiche. Successivamente il prodotto di PCR viene miscelato con una soluzione *loading buffer*, composta da blu di bromofenolo allo 0.25% v/v, xilene cianolo 0.25% v/v, glicerolo al 50% v/v ed EDTA concentrato 50 mM. Quindi il prodotto viene caricato su gel alloggiato in una vaschetta elettroforetica che viene immersa in TBE 0.5X. Insieme al campione viene caricato anche un marker di pesi molecolari commerciali di 1 Kb (*New England Biolabs*) che ci consente di avere un'indicazione del peso delle bande corse su gel.

Tale step è seguito dalla digestione con la metilasi DpnI, necessaria al fine di ottenere un campione formato esclusivamente da DNA mutato ottenuto dal processo di mutagenesi. In questa fase è prevista la digestione del DNA stampo, che in quanto metilato viene eliminato mediante l'azione della metilasi DpnI. Il DNA mutato invece resta intatto e sarà usato poi per trasformare le cellule ospiti. Al prodotto di PCR vengono aggiunti 1 µl di DpnI (*New England Biolabs*) e 5 µl buffer 4; il tutto è stato incubato a 37°C per 150 minuti.

Per pulire il DNA mutato ottenuto dai reagenti della mix di PCR e digestione viene fatto uno step di purificazione utilizzando il kit *MinElute PCR purification kit protocol* (*Quiagen*). Il campione viene quindi eluito in 25 µl di *EB buffer* (*Elution Buffer*) del kit.

A questo punto è necessario andare ad amplificare su larga scala i costrutti mutati ottenuti dal processo di PCR, attraverso lo step di trasformazione batterica. La trasformazione batterica è uno dei processi attraverso cui le cellule batteriche sono in grado di assumere e amplificare DNA esogeno, grazie al loro veloce tasso di replicazione. Il ceppo batterico utilizzato in questo lavoro di tesi è quello delle *XL10GOLD di E.coli* (*Stratagene*). L'intero procedimento consta delle fasi di seguito esposte:

- scongelare in ghiaccio una vial (50 µl) di *One Shot® XL10GOLD* per ciascuna mix;

- aggiungere 4 µl di β-mercaptoetanololo alla vial contenente le cellule e incubare in ghiaccio per 10 minuti;
- aggiungere 4.5 µl di campione contenente il DNA a ciascuna vial e agitare delicatamente;
- incubare in ghiaccio per 30 minuti;
- applicare uno shock termico a 42°C per 30 secondi in un bagnetto termostato;
- porre le vial in ghiaccio per 2 minuti;
- aggiungere 250 µl di terreno S.O.C. (*Super Optimal broth with Catabolite repression, Invitrogen*) a temperatura ambiente lentamente all'interno della vial;
- porre le vial in agitazione orizzontale in un incubatore a 37°C, 700 RPM (*Revolutions Per Minute*), per 1 h;
- distribuire tutto il contenuto in piastre Petri, preriscaldate, di *LB agar (Luria-Bertani agar)* supplementato con l'antibiotico kanamicina 50 µg/ml (*Sigma-Aldrich*) e spargere il campione con l'aiuto di un'ansa di plastica usa e getta, finché non si sarà asciugato;
- riporre le piastre sottosopra (eventuali condense cadranno sul coperchio piuttosto che sul terreno) in un incubatore a 37°C per tutta la notte (OVER NIGHT, ON).

Scaduto il tempo d'incubazione, si procede con l'espansione dei batteri prima su piccola scala; a tale scopo con i puntali si raccolgono le colonie selezionate dalla piastra e si procede con una fase di precrescita. Le colonie vengono risospese in 5 ml di *LB broth (Luria-Bertani broth)* e 5 µl di kanamicina 50 mg/ml, successivamente vengono poste in incubatore per circa 16 h con un'agitazione a 225 RPM.

A partire da ogni tubo di precrescita viene fatta un'estrazione plasmidica utilizzando il kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)*; successivamente verranno fatti sequenziare 15 µl di ogni aliquota concentrati 50-100 ng/µl, al fine di verificare che sia stata indotta la mutazione desiderata. Nel dettaglio il servizio utilizzato è il sequenziamento Sanger offerto dalla ditta *Eurofins MWG Operon*, a cui il campione è spedito; il sequenziamento avviene a partire da sequenze oligonucleotidiche (*sequencing primer*) disegnate ad hoc sul plasmide con l'ausilio del software *Serial Cloner*. I *primer* per il sequenziamento devono avere una lunghezza di circa 20 bp, una temperatura di *melting* pari all'incirca a 50°C, devono essere privi di sequenze ripetute,



con un contenuto in GC compreso tra 40 e 60% e possibilmente devono finire con la base citosina.

Una volta verificati i cloni corretti, è necessario amplificare notevolmente il numero di copie, per avere più materiale di partenza a disposizione negli esperimenti successivi. A partire da 500 µl di precrescita, precedentemente conservato alla temperatura di 4°C, si aggiungono 5 µl di *kanamicina* e si risospende il tutto in 5 ml di *LB broth*; si procede quindi ad un'ulteriore fase di precrescita in incubatore a 37°C, 225 RPM per la durata di circa 8 ore. Trascorse le 8 ore si procede alla fase di crescita batterica vera e propria, in cui i 5 ml di precrescita, vengono risospesi in 250 ml di *LB broth*, supplementari ulteriormente con 250 µl di *kanamicina* e incubati ON a 225 RPM, alla temperatura di 37°C. Per il processo di estrazione del DNA, a partire da tale crescita batterica, viene utilizzato il kit *QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen)*. Al termine del protocollo si procede a una quantificazione spettrofotometrica.

Tale protocollo di mutagenesi è stato adoperato per la generazione dei mutanti puntiformi a livello di singole tirosine. Per la generazione dei mutanti combinati *Kinase-Mutant* e *Recruitment-Mutant* la procedura seguita è stata la seguente: a partire dal template di uno dei mutanti puntiformi precedentemente prodotti si induce una seconda mutazione a livello del residuo che si intende mutare, con l'ausilio dei primer specifici per tale sequenza. Una volta ottenuto il doppio mutante, allo stesso modo, su di questo viene indotta una terza mutazione a carico del residuo desiderato.



**Figura 3.2. Rappresentazione schematica della generazione del triplo mutante.** a) schema di generazione del mutante *Kinase-Mutant*; b) schema di generazione del mutante *Recruitment-Mutant*.

### 3.1.3. Quantificazione del DNA

Il DNA viene quantificato in concentrazione mediante misura effettuata al biofotometro (*Eppendorf*), strumento che legge l'assorbanza a diverse lunghezze d'onda, tra cui 260 nm e 280 nm. Tali valori di assorbanza consentono di ottenere i valori di concentrazioni di DNA corrispondenti, attraverso l'applicazione della legge di *Lambert-Beer*, conoscendo il coefficiente d'estinzione molare per coppia di basi di DNA e correggendo per l'eventuale presenza di proteine. La sorgente di luce è una lampada allo Xenon, la cuvetta utilizzata è una Uvette (*Eppendorf*). Si esegue prima la lettura di un "bianco", ossia di una soluzione contenente il tampone in cui il DNA da quantificare è risospeso, che restituirà un valore di assorbanza che sarà automaticamente sottratto alle misure di assorbanza fatte per le soluzioni in presenza di DNA. Si procede quindi a letture in triplo per ogni campione, considerando tre diluizioni (1:50, 1:100, 1:200) della soluzione di partenza. Per ottenere il valore finale si calcola la media aritmetica dei valori calcolati delle singole diluizioni.

## 3.2. Mantenimento della linea cellulare

Gli esperimenti descritti in questa tesi di laurea sono stati tutti effettuati sulla linea cellulare immortale *SH-SY5Y*, derivata da neuroblastoma umano. La conservazione degli stock avviene in azoto liquido, all'interno di cryovials vengono aggiunti ad una miscela di 900 µl di sospensione cellulare in *FBS (Fetal Bovine Serum)*, 100 µl di *DMSO (Dimethyl Sulfoxide)*, un agente crioprotettivo utilizzato per impedire la formazione di cristalli di ghiaccio intra e intercellulari che si potrebbero formare in seguito al rapido processo di congelamento. Al momento dello scongelamento le vials vengono poste nel bagnetto termostato a 37°C, supplementate con 9 ml di terreno *DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)* supplementato con il mix di nutrienti F-12 e piastrate in *Petri Dishes* da 100 mm di diametro. In seguito alla piastratura le

cellule aderiranno al fondo della petri e cominceranno a dividersi fino a raggiungere uno stato di confluenza. Quando la percentuale di confluenza sarà del 90-95% le cellule verranno staccate dalla piastra (*splitting*) allo scopo di evitare l'instaurarsi di inibizioni da contatto dovute alla stretta vicinanza tra le cellule e la loro successiva morte. L'operazione di *splitting* prevede innanzitutto l'aspirazione del mezzo di coltura presente sulla piastra, a cui seguono due lavaggi successivi in 5/6 ml di *DPBS1x* (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco, Invitrogen*). A questo punto verranno aggiunti 2 ml di *Tripsina-EDTA al 2.5%* (*Gibco, Invitrogen*) per favorire il distacco delle cellule dal fondo della piastra e quest'ultima verrà posta in incubazione a 37°C per 3/4 minuti. Successivamente verranno aggiunti 8 ml di terreno per inattivare la tripsina e la sospensione verrà centrifugata a 1200 rpm per 5 minuti. A questo punto aspirato il surnatante, risospenderemo le cellule in 10 ml di terreno e procederemo con la piastratura in nuove p100.

### 3.3. Trasfezione

Il giorno precedente a quello di trasfezione si procede con la semina delle cellule SH-SY5Y. Le cellule staccate dalla piastra P100 vengono risospese in 8 ml di terreno DMEM/F-12 da cui vengono prelevati 10 µl per effettuare la conta cellulare con *trypan blue* 0.4%, che è un colorante che seleziona specificatamente le cellule morte. Si procede con la centrifuga a 1200 rpm per 5 minuti e successiva risospensione in terreno DMEM/F-12 privo di antibiotico. Siccome la semina verrà fatta in P30 sono necessarie  $8 \times 10^5$  cellule per ogni piastra. Si procede quindi con la semina cellulare. Il giorno seguente le cellule vengono trasfettate con la formulazione di liposomi commerciale *Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent* 1 mg/ml (*Invitrogen*) combinato con il terreno *Opti-MEM® I Reduced Serum Medium*.

Di seguito viene riportato il protocollo di trasfezione fornito dalla ditta:

- mettere a scaldare il terreno Opti-MEM® in bagnetto termostato a 37°C;
- preparare la prima mix costituita da 4.0 µg di DNA in 250 µl di Opti-MEM®, miscelata meccanicamente dando dei leggeri colpi alla vial;

- preparare la seconda mix costituita da 10 µl di Lipofectamine® 2000 aggiunti a 250 µl di Opti-MEM® e mescolata come descritto precedentemente per la mix1;
- incubare entrambe le mix per 5 minuti a temperatura ambiente (Room Temperature, RT);
- unire le due mix in un'unica vial per un volume totale di 500 µl, facendo attenzione ad aggiungere la seconda mix all'interno della prima, una goccia alla volta. Ulteriore stimolazione meccanica e spin in centrifuga;
- incubare 20 minuti a RT;
- aggiungere 500 µl di soluzione alla P30 contenente le cellule e il terreno;
- riporre la P30 in incubatore con 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

Dopo un tempo d'incubazione di 5 ore dall'aggiunta della mix di trasfezione è necessario cambiare il terreno di coltura e trasferire le cellule in *willco petri dish*, necessarie per la successiva acquisizione al microscopio. Si procede nel seguente modo:

- due lavaggi in 1.5 ml di PBS;
- aggiunta di 350-500 µl di tripsina per staccare le cellule dal fondo della piastra;
- incubazione di 2-3 minuti a 37 °C;
- aggiunta di 1.2 ml di terreno DMEM-F12 completo per ogni willco e semina.

Il controllo di avvenuta trasfezione viene fatto con l'utilizzo di un microscopio a epifluorescenza in quanto i costrutti testati esprimono eGFP, a livello del plasmide p-IRES2-eGFP nel quale sono stati clonati.

### 3.4. Preparazione dei lisati proteici

Per la valutazione della presenza di una specifica proteina da saggiare all'interno di un campione d'interesse si adotta la tecnica del *Western Blot*. Il materiale di partenza per effettuare la suddetta analisi è un estratto proteico ottenuto dalla lisi di cellule previamente trasfettate con la proteina d'interesse. Le procedure utilizzate per ottenere un estratto proteico grezzo richiedono la rottura delle cellule in uno specifico buffer di lisi

*RIPA Buffer (Sigma-Aldrich)* contenente 150 mM di NaCl, 1.0% di un detergente non denaturante IGEPAL<sup>®</sup> CA-630, 0.5% di sodio desossicolato, 0.1% di SDS, 50 mM di Tris a pH 8.0, infine inibitori di proteasi e fosfatasi. L'intero processo deve essere effettuato in ghiaccio, al fine di evitare i processi di *unfolding* e degradazione a carico delle proteine.

La preparazione dei lisati proteici viene eseguita seguendo il protocollo qui di seguito riportato:

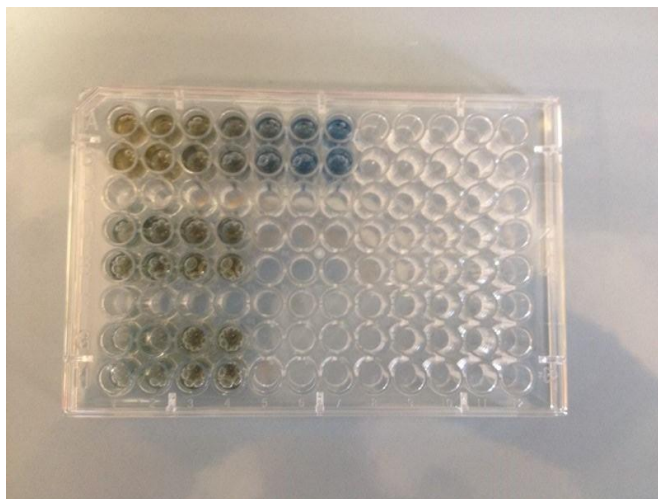
- il buffer di lisi e una soluzione di PBS sterile vengono posti in ghiaccio;
- le piastre (p60) su cui sono state fatte crescere le cellule vengono prelevate dall'incubatore a 37 °C e poste su una vaschetta contenente ghiaccio;
- le cellule vengono sottoposte a 3 lavaggi da 5 ml ciascuno di PBS freddo;
- alle piastre contenenti le cellule vengono aggiunti 250 µl di buffer di lisi ponendolo esattamente al centro della piastra;
- con l'ausilio di uno *scraper* vengono grattate tutte le cellule che si sono staccate dalla piastra in seguito all'azione del buffer di lisi; la soluzione risultante avrà un'aspetto biancastro. La piastra viene poi inclinata per recuperare il lisato cellulare che verrà trasferito in una vial;
- le vial verranno centrifugate a 12000 RPM per 20 minuti a 4 °C per il processo di chiarificazione, che prevede la rimozione di micelle di membrana, DNA genomico o materiale particolato che può andare a compromettere successive reazioni e passaggi di purificazione;
- il surnatante recuperato rappresenta la frazione proteica e viene conservato a -80°C.

### 3.5. Saggio di Bradford

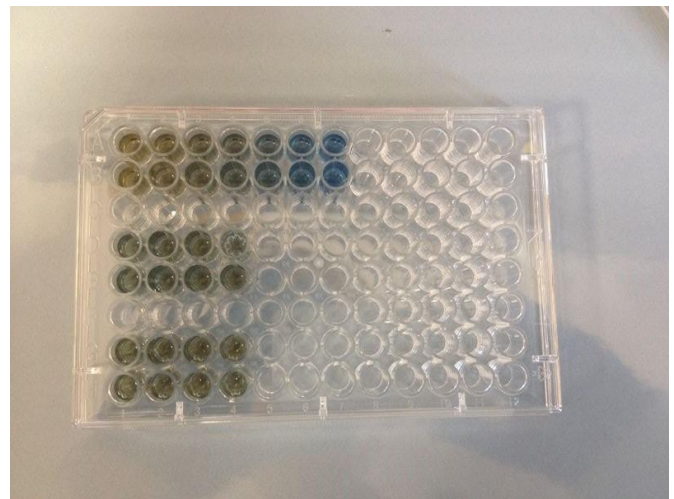
Per determinare la concentrazione della proteina d'interesse all'interno di un lisato proteico viene effettuato un saggio di Bradford, un metodo quantitativo che consente di ottenere misure di assorbanza con l'ausilio del colorante *Comassie Brilliant Blue G-250* in grado di legare le proteine. L'assorbanza relativa al colorante da solo in soluzione ha un massimo a 465 nm, valore che sale a 595 nm in presenza di proteine. Al valore di 595 nm l'assorbanza rilevata è direttamente proporzionale alla concentrazione del

campione, il che permette di costruire una retta di taratura di uno standard proteico, la *BSA (bovine serum albumin)*. Vengono quindi preparate in doppio, a partire da uno stock concentrato 2 mg/ml, diluizioni scalari della BSA da 1000 µg/ml a 100 µg/ml in PBS buffer. Allo stesso modo vengono preparate in doppio le diluizioni 1:10 e 1:20 dei lisati proteici a concentrazione ignota. A questo punto vengono aggiunti ai pozzetti di una piastra da 96 pozzetti (96 well-plate) da 3 a 5 µl di ogni diluizione preparata, relative sia alla BSA che ai campioni da saggiare. Vengono di seguito aggiunti in ogni pozzetto 150 µl di soluzione di Bradford, facendo attenzione a non fare bolle, le quali abbiamo visto essere causa di alterazione della lettura (Figura 3.3). La lettura dell'assorbanza viene effettuata al microplate reader alla lunghezza d'onda di 595 nm. I punti di concentrazione dello stock di BSA diluito vengono interpolati con una retta che costituirà la retta di taratura del saggio; affinché il saggio sia valido il valore del coefficiente di interpolazione lineare  $R^2$  deve essere maggiore di 0.96, in caso contrario il saggio deve essere ripetuto. I valori di concentrazione ignoti vengono ottenuti dall'equazione della retta di regressione e utilizzando i valori di assorbanza sperimentalmente trovati per i campioni.

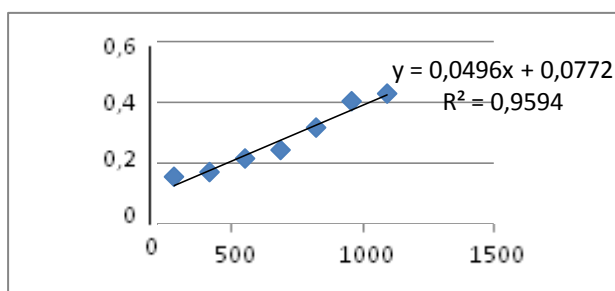
**A**



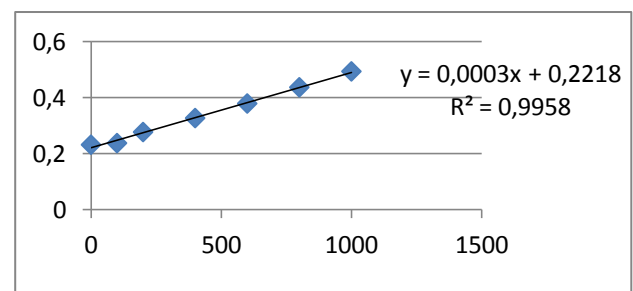
**B**



**C**



**D**



**Figura 3.3. Confronto della misura del saggio di Bradford in presenza e assenza di bolle.** A) La presenza di bolle all'interno del campione altera la misura di assorbanza; B) L'assenza di bolle all'interno del campione permette di ottenere una misura del saggio di Bradford corretta; C) Retta di taratura relativa alla misura di assorbanza effettuata in presenza di bolle ( $R^2 < 0.96$ ); D) Retta di taratura relativa alla misura di assorbanza effettuata in assenza di bolle ( $R^2 > 0.96$ ).

## 3.6. Western blot

Il *Western Blot (WB)* è una tecnica biochimica che consente di riconoscere una determinata proteina all'interno di un lisato proteico, sfruttando la specificità di riconoscimento da parte di anticorpi. Una quantità nota di lisato proteico viene fatta correre in un primo momento su gel di acrilammide in condizioni denaturanti per separare le diverse proteine presenti in base al loro peso molecolare, le bande risultanti vengono quindi trasferite elettroforeticamente su una membrana di nitrocellulosa o *PVDF (polivinilidenfluoruro)*; la scelta della membrana da utilizzare viene fatta anche in base all'anticorpo che si intende usare in fase di *blotting*, nel presente lavoro di tesi è stata scelta una membrana di PVDF. Sulla membrana verrà effettuato il *blot* con anticorpo primario che riconosce e lega la proteina d'interesse, contro il quale verrà mandato l'anticorpo secondario per la rivelazione del segnale.

Il protocollo utilizzato è il seguente:

- per la corsa elettroforetica sono necessari 50 µg di lisato proteico, ai quali verrà aggiunta un'opportuna quantità di SDS *gel loading buffer*;
- i campioni preparati vengono posti per la denaturazione in termoblocco a 95 °C per 10 minuti;
- inserimento del gel precast nell'alloggiamento della vaschetta di corsa. I gel precast usati sono dei *Criterion Precast Gel (Bio-Rad)* con percentuale di poliacrilammide a gradiente crescente dal 4 al 12%.

- riempimento della vaschetta di corsa con il buffer di corsa, composto per 1 litro di soluzione da 50 ml di *XT MOPS running buffer 20X (Biorad)* diluito in 950 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata;
- lavaggio dei singoli pozzetti attraverso l'ausilio di una siringa per evitare residui di acrilammide che potrebbero inficiare la corsa elettroforetica;
- caricamento del ladder di peso molecolare *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope Standards (Bio-Rad)* e dei campioni d'interesse e avvio della corsa ad un voltaggio di 80-100 V; al termine della corsa il gel viene estratto dal supporto di plastica in cui era impaccato, ne viene tagliato un angolo nella direzione in cui è avvenuta la corsa e viene momentaneamente posto all'interno di una soluzione di *Transfer Buffer*, un buffer che facilita il trasferimento delle bande (quindi delle proteine) dal gel alla membrana. La composizione del *Transfer Buffer* è riportata in Tabella 3.2.

	<b>Concentrazione iniziale</b>	<b>Concentrazione finale</b>	<b>Volume</b>
<b>MeOH</b>	100% v/v	20% v/v	400 ml
<b>TG buffer (Tris/Glycine Buffer -Biorad)</b>	10X	1X	200 ml
<b>H<sub>2</sub>O deionizzata</b>	-	-	1400 ml
<b>Volume finale</b>	-	-	2000ml

**Tabella 3.2. Composizione del *Transfer Buffer*.**

Nella preparazione del *Transfer Buffer* il metanolo viene aggiunto solo alla fine per evitare la precipitazione della glicina.

- Attivazione della membrana di PVDF per 1 min in metanolo assoluto;
- preparazione del sandwich nel seguente ordine che riflette il verso della corsa che si va ad eseguire: Intelaiatura nera – Spugna – Carta da filtro sottile (Whatman) – Carta da filtro spessa (*filter pad, Biorad*) – Gel (messo al contrario per avere il verso corretto sulla membrana) – Membrana di PVDF – Carta da filtro spessa – Carta da filtro sottile – Spugna - Intelaiatura rossa;



- inserimento del sandwich all'interno della camera di corsa opportuna, riempimento della medesima con *Transfer buffer* e alloggiamento ulteriore di un panetto di ghiaccio nell'apparecchio al fine di evitare il surriscaldamento. Il processo di trasferimento delle proteine da gel a membrana viene fatto andare ON in una stanza fredda alla corrente di 0.25 Ampere e alla temperatura di 4 °C;
- terminato il trasferimento avviene l'alloggiamento della membrana, sul quale si saranno trasferite le proteine, in una vaschetta al di sopra di una bilancia e successivi 3 lavaggi da 5 minuti, fino a coprire tutta la superficie, con una soluzione di *TBST 1X* (composizione in Tabella 3.3), ottenuta aggiungendo *Tween-20* ad una soluzione di *TBS 1X* (*Tris-buffered saline*);

	<b>Concentrazione iniziale</b>	<b>Concentrazione finale</b>	<b>Volume</b>
<b><i>NaCl</i></b>	5M	1.5 M	300 ml
<b><i>Tris HCl pH 7.4</i></b>	1M	0.2 M	200 ml
<b><i>Tween-20</i></b>	100% v/v	0.05% v/v	500 µl
<b><i>H2O deionizzata</i></b>	-	-	499.5 ml
<b><i>Volume finale</i></b>	-	-	1000 ml

**Tabella 3.3. Composizione del buffer TBST 1X.**

- *blocking* di 1 ora a RT con una soluzione di TBST 1X supplementata con *Non-Fat Dry Milk* (Bio- Rad), una polvere usata per andare a saturare i siti di legame aspecifici grazie alle proteine in essa contenute. Il *Non-Fat Dry Milk* viene pesato in modo da avere una concentrazione finale di 5% w/v, che equivale ad una quantità di 2.5 g di polvere disciolti in 50 ml di soluzione di TBST 1X;
- eliminare la soluzione di *blocking* ed aggiungere la soluzione con anticorpo primario diluito in TBST+ Milk, procedere col *blotting* per 2 ore a RT. L'anticorpo primario utilizzato è il *Rabbit Polyclonal Anti-TrkA* 1 mg/ml (06-574, Millipore) diluito 1:1000.
- recupero della soluzione di anticorpo primario e successivi 3 lavaggi da 10 minuti ciascuno con soluzione di TBST 1X;
- aggiunta dell'anticorpo secondario *Goat anti-Rabbit IgG (H+L)- HRP Conjugate* (170-6515, Bio-Rad) diluito 1:2500 (concentrazione non dichiarata dal *datasheet*)

in TBST+ Milk e *blotting* di 1 ora a RT. L'anticorpo secondario è coniugato con l'enzima perossidasi di rafano, in grado di emettere un segnale chemiluminescente quando a contatto con un substrato cromogeno;

- 3 successivi lavaggi di 5 minuti ciascuno con soluzione di TBST 1X;
- sviluppo della membrana grazie all'utilizzo di due soluzioni di *Clarity<sup>TM</sup> Western ECL Substrate (Biorad)*, utilizzate in rapporto 1:1 in grado di produrre un substrato cromogeno utilizzato dalla perossidasi di rafano associata all'anticorpo secondario per dare un segnale chemiluminescente in corrispondenza della banda relativa alla proteina d'interesse. Le due soluzioni vengono poste e mescolate su un foglio di parafilm, sul quale verrà adagiata la membrana (con il lato delle proteine rivolto verso tale superficie) facendo attenzione che venga coperta dal liquido. Si lascia quindi agire per 1 minuto;
- la membrana viene quindi posta su un foglio di acetato e la chemiluminescenza rivelata al *Gel Imager LAS 4000*. Siccome il segnale generato dalle soluzioni usate per lo sviluppo tende a decadere nel tempo è consigliabile eseguire questo processo nel minor tempo possibile.

Una volta rivelata la proteina d'interesse dalla membrana, possiamo procedere a rivelarne un'altra attraverso un nuovo *blot* con anticorpo specifico; affinché questo sia possibile devono essere rimossi dalla membrana gli anticorpi precedentemente usati attraverso la reazione di *stripping*, che prevede le seguenti tappe:

- inserire la membrana in un tubo da 50 ml contenente 50 ml di *Stripping Buffer 1X* (composizione in Tabella 3.4), a cui vengono aggiunti 352 µl di β-mercaptoetanololo;
- porre il tubo per 30 minuti in bagnetto termostato a 50°C (invertire il tubo ogni 10 minuti);
- svuotare il tubo dalla soluzione e riporre la membrana in una vaschetta;
- procedere quindi col *blotting*, come descritto precedentemente.

	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume
Tris-HCl pH=6.8	1M	0.5M	250 ml
SDS	20%	2%	50 ml
H <sub>2</sub> O deionizzata	-	-	200 ml
Totale	-	-	500 ml

**Tabella 3.4.** Composizione dello *Stripping Buffer* per una soluzione con volume finale di 500 ml.

### 3.8. Reazione di *labelling* del recettore TrkA sulla membrana di cellule vive

La reazione di *labelling* consiste in due step: biotinilazione dell'ACP fuso al dominio extracellulare del recettore TrkA, catalizzata da PPTasi e successiva coniugazione di Q-Dot, funzionalizzati con streptavidina, che lega la biotina tramite un legame estremamente forte (quasi al livello di un legame covalente), in modo tale da consentire la successiva analisi al microscopio TIRF.

A 24 ore dalla trasfezione del costrutto ACP-TrkA e/o delle sue varianti mutate, le cellule vengono sottoposte ad un lavaggio in 1.5 ml di PBS, successivamente vengono aggiunti 1.2 ml di terreno di starvation, composto da BSA 0.5% w/v e terreno DMEM-F12 non supplementato con antibiotico. Le cellule vengono quindi incubate a 37 °C per 2 ore.

Terminato il tempo d'incubazione, le cellule sono pronte per la reazione di biotinilazione; i componenti per la realizzazione della mix di biotinilazione sono riportati nella Tabella 3.6.

	<b>Concentrazione iniziale</b>	<b>Concentrazione finale</b>	<b>Volume</b>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1M	10mM	5µl
<b>CoA-biotin</b>	1mM	5µM	2.5µl
<b>ACP-sintase oppure SFP-sintase</b>	40µM	1µM	12.5µl
<b>Terreno di <i>starvation</i></b>	-	-	477.5µl
<b>Totale</b>	-	-	500µl

**Tabella 3.6. Composizione mix di biotinilazione.**

Acp sintasi (AcpS) e Sfp sintasi (SfpS) sono le PPTasi che catalizzano il trasferimento della biotina al tag.

La reazione di *labelling* procede con il seguente protocollo:

- aspirazione del terreno utilizzato per la *starvation* dalle wilco;
- aggiunta della mix di biotinilazione e incubazione per 30 minuti a 37 °C;
- 2 lavaggi con 1 ml di PBS;
- aggiunta della mix di *Quantum-Dot655* (Tabella 3.7) e incubazione per due minuti a RT;
- 8 lavaggi con 1 ml di PBS;
- aggiunta di 1 ml di *Imaging Medium* e acquisizione al microscopio TIRF.

Nel corso degli esperimenti effettuati in tale lavoro di tesi è risultato fondamentale il numero dei lavaggi da effettuare in seguito all'aggiunta della mix di Quantum-Dot. Un numero di lavaggi maggiore o uguale a 8 sembrerebbe ridurre la presenza di Quantum-Dots immobili adesi aspecificamente al vetrino, migliorando in tal modo la qualità dell'analisi delle traiettorie successiva all'acquisizione al microscopio TIRF.

	<b>Concentrazione iniziale</b>	<b>Concentrazione finale</b>	<b>Volume</b>
<b>S-QDot655</b>	1 $\mu$ M	2 nM	1 $\mu$ l
<b>Q-Dots Binding Buffer</b>	-	-	499 $\mu$ l
<b>Totale</b>	-	-	500 $\mu$ l

**Tabella 3.7. Composizione della mix dei Q-Dot.**

Per l'acquisizioni in microscopia confocale la strategia di marcatura è la medesima con la differenza che verrà usata una concentrazione di QDot maggiore di quella utilizzata per gli studi a singola molecola sfruttando la microscopia TIRF (all'incirca 10 nM).

I campioni relativi ai 4 costrutti oggetto d'esame prima di essere osservati in microscopia confocale, vengono marcati, come riportato dal protocollo che segue:

- sterilizzare i vetrini coprioggetti in etanolo al 96%, porli sul fondo di una piastra P60 e lasciarli ad asciugare;
- nel frattempo staccare le cellule SH-SY5Y precedentemente messe in coltura; seguire tutto il protocollo di *splitting* descritto precedentemente; risospendere le cellule staccate in terreno DMEM-F12 privo di antibiotico e seminarle sulla petri contenente il vetrino. La mattina seguente procedere alla trasfezione dei costrutti, seguendo il protocollo di trasfezione sopra menzionato, facendo attenzione a porre la mix di trasfezione a livello del vetrino; dopo 5-6 ore rimuovere il terreno contenente la mix di trasfezione e aggiungere un'opportuna quantità di terreno DMEM-F12 completo;
- la mattina seguente i 4 vetrini vengono posti in una piastra six-well, uno per ogni pozzetto della piastra;
- ad ogni pozzetto vengono aggiunti 500  $\mu$ l di buffer PBS con  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , poi aspirato;
- vengono aggiunti ad ogni pozzetto 250  $\mu$ l di terreno di *starvation*; la piastra six-well viene incubata a 37°C per 2 ore;

- a questo punto i pozzetti contenenti i vetrini vengono sciacquati e subito dopo viene aggiunta la mix di biotinilazione (composizione in Tabella 3.6), segue un'incubazione per 30 minuti a 37°C;
- segue un'incubazione 30 minuti a 4°C ponendo anche le piastre six-well su vaschette contenenti ghiaccio; terminata l'incubazione vengono effettuati due sciacqui con 500 µl PBS con Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>;
- a questo punto possiamo aggiungere la mix contenente i QDot concentrati 10 nM, la quale servirà per la marcatura del recettore; segue un'incubazione per 30 minuti a 37°C;
- terminata l'incubazione seguono 8 lavaggi con 500 µl PBS con Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>;
- a questo punto si procede con il fissaggio dei vetrini mediante l'agente paraformaldeide (PFA) al 4% supplementato con saccarosio al 2%; una volta aggiunta la PFA segue un'incubazione a RT per 20 minuti, facendo attenzione ad avvolgere la piastra six-well in carta stagnola;
- seguono 3 lavaggi con 500 µl di PBS freddo precedentemente microfiltrato, poi un lavaggio in acqua deionizzata;
- i vetrini sono così pronti per essere montati sul vetrino porta oggetti, sul quale è stata precedentemente posta una goccia di soluzione del montante *Fluoroshield™ with DAPI* (Sigma-Aldrich);
- si può ora procedere all'acquisizione delle immagini al microscopio confocale.

## **3.9. Acquisizione dei campioni marcati mediante microscopia**

### **3.9.1. Acquisizione dei campioni mediante microscopia confocale**

Le immagini relative ai campioni, precedentemente marcati e fissati su vetrino, sono state acquisite grazie ad un microscopio confocale Leica TCS SP5. Il setup sperimentale ha previsto l'utilizzo di un'obiettivo 100X ad immersione in olio con un'apertura numerica di 1.35, un pinhole settato a 1 *Airy Unit* (AU) e un fotogramma di dimensioni pari a 512X512 pixel. I vari canali di acquisizione sono caratterizzati dalla lunghezza d'onda del laser utilizzato per l'eccitazione e dall'intervallo di lunghezze d'onda in cui è raccolta l'emissione relativa ai vari fluorofori che andranno a marcare le differenti componenti cellulari: il canale della GFP permetterà la visualizzazione di tutta la cellula, il canale del DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) la visualizzazione del nucleo e infine il canale dei QDot655 permetterà la visualizzazione dei recettori. Per visualizzare sia il canale della GFP che dei QDot655 viene utilizzata la riga a 488 nm di un laser ad Argon, con finestra di emissione 500-550 nm per quanto riguarda il canale delle GFP e 640-670 nm per il canale dei QDot. Per quanto riguarda il canale del DAPI la lunghezza d'onda utilizzata per l'eccitazione è di 405 nm, mentre il range d'emissione in questo caso è compreso tra i valori 410-470 nm.

### **3.9.2. Acquisizione dei campioni mediante microscopia TIRF**

I campioni una volta marcati con Q-Dots sono pronti per essere osservati mediante microscopia TIRF; a tale scopo il microscopio utilizzato è stato un *Leica DM6000* supplementato con il modulo TIRF-AM. Il sistema è dotato di quattro linee laser e di una telecamera del tipo *electron multiplier charge coupled device* (EM-CCD; ImagEM C9100-13, *Hamamatsu*). L'obiettivo utilizzato è stato un obiettivo ad immersione in olio *HCX PL APO 100.0X* con l'apertura numerica di 1.47. Il microscopio è dotato di un incubatore a 37°C e con una percentuale di CO<sub>2</sub> del 5% nel quale viene posto il

campione per l'osservazione. Le cellule trasfettate sono state in primo luogo osservate in fluorescenza, ciò è possibile sfruttando il segnale dell'eGFP emesso costitutivamente dai costrutti da noi trasfettati. Individuate le cellule trasfettate si passa all'analisi in microscopia TIRF per valutare la mobilità dei recettori marcati con Q-Dots. Per visualizzare i Q-dots è stata usata in eccitazione una luce laser alla lunghezza d'onda di 488 nm e un filtro d'emissione specifico (Semrock FF01-655/15 ). La lunghezza di penetrazione dell'onda evanescente è stata impostata a 90nm. Una volta trovate le cellule trasfettate viene selezionata una regione d'interesse (Region Of Interest – ROI ) a livello della membrana basale. Sono stati quindi fatti dei filmati della durata di 3000 fotogrammi, in cui ciascun fotogramma ha la durata di 21 ms: la dimensione della ROI è stata scelta in modo che il tempo di lettura del chip della CCD sia inferiore al tempo di integrazione di 21 ms, in modo da sfruttare una modalità di acquisizione della specifica CCD (*overlapping mode*) che permette di integrare il segnale su parte del chip mentre il fotogramma precedente viene trasferito al computer. Infine sono state fatte acquisizioni in DIC (*Differential Interference Contrast* ) per un controllo ulteriore della morfologia cellulare.

## **3.10. Utilizzo di software di analisi**

Mediante l'acquisizione al microscopio TIRF vengono prodotti dei filmati in tre dimensioni (X,Y e t) che verranno processati da due software d'analisi: il primo di questi restituisce il profilo delle traiettorie effettuate dai recettori a livello della membrana basale, mentre il secondo fornisce i dati necessari alla caratterizzazione quantitativa dei moti diffusivi delle singole molecole.

### **3.10.1. Costruzione delle traiettorie**

Il software utilizzato per la costruzione delle traiettorie è il software *Imaris x64 7.3.0* (*Bitplane Scientific Software*) che analizza i filmati ottenuti e individua la posizione e intensità di fluorescenza di ogni zona (spot) relativa ad una singola particella marcata con Q-Dot. Sovrapponendo un fotogramma del filmato acquisito in TIRF con l'immagine acquisita in DIC o in fluorescenza vengono innanzitutto eliminati tutti gli spot al di fuori



della membrana basale che sono adesi in modo aspecifico al vetrino e che potrebbero andare ad alterare i risultati delle analisi; vengono inoltre eliminati anche gli spot presenti a livello dei filipodia, in cui la mobilità del recettore è condizionata dalla morfologia cellulare. Vengono escluse dall'analisi anche tutte le acquisizioni in cui all'interno della cellula c'è un livello di over-espressione del recettore, selezionando cellule in cui si possono vedere meno di circa 200 recettori per fotogramma all'interno della ROI. Gli spot vengono identificati trovando i massimi locali dell'intensità nei vari fotogrammi, ed il loro centro viene determinato con precisione inferiore al pixel, calcolando il centroide dello spot. Il programma permette inoltre di eliminare il rumore di fondo e l'analisi di spot troppo grandi o troppo piccoli partendo dalla dimensione fornita della funzione di allargamento del punto (*Point Spread Function – PSF*), in genere fissata ad un diametro massimo di 0.80  $\mu\text{m}$ , e potendo variare dei parametri di “qualità” dello spot entro cui accettare gli spot stessi in modo interattivo.

La traiettoria 2D risulta dal collegamento di ogni spot di un fotogramma con quelli trovati nei fotogrammi precedenti e successivi. Qualora le traiettorie fossero interrotte a causa del fenomeno di *blinking*, ovvero il fenomeno di lampeggiamento del segnale di fluorescenza tipico dei QDot, i diversi segmenti della stessa traiettoria possono essere ricollegati.

Sono stati impostati parametri per il collegamento automatico di questa traiettoria, pari ad 1  $\mu\text{m}$  massimo di spostamento, e che permettono di collegare segmenti di traiettoria fino a 30 fotogrammi di distanza.

## 3.10. 2. Analisi delle traiettorie

Le informazioni che vengono ricavate dall'analisi delle traiettorie, come la sua lunghezza, l'intensità dello spot e le coordinate x e y in funzione del numero di fotogrammi, vengono processate con il modulo *Imaris XT*, in grado di interfacciare l'*output* di analisi con *MATLAB*. Le traiettorie risultanti sono state analizzate sempre tramite un codice precedentemente sviluppato presso i laboratori NEST.

I dati vengono sottoposti ad una prima analisi MSD che determina il tipo di moto della molecola, da cui si ricavano diversi parametri tipici della traiettoria. Tale analisi non tiene però conto della multimodalità del moto di un recettore e per tale motivo viene seguita da una successiva analisi TAD (*transient arrest of diffusion*) che divide ogni

traiettoria multimodale in due o più porzioni caratterizzate ciascuna da un singolo moto, derivata dal metodo STALL (*Stimulated Transient Arrest of Lateral diffusion*) sviluppato in (Suzuki et al., 2007). Dall'analisi delle traiettorie vengono estrapolati diversi parametri, come il  $D_{12}$ , derivato dal coefficiente angolare della retta passante per i primi due punti dell'MSD. Un altro parametro che si ricava dall'analisi è la dimensione dell'area di confinamento della molecola che dipende dal parametro  $L$  e dallo spostamento quadratico medio  $\sigma_r^2$  dei punti che creano la traiettoria dalla media delle loro coordinate. Per determinare la distribuzione di questi parametri ( $D_{12}$  e  $L$ ) ogni traiettoria viene pesata in base al numero dei punti che la compongono, e viene normalizzata con area ad 1 o alla frazione di traiettorie considerate per il coefficiente di diffusione ( $D_{12}$ ) o della lunghezza dell'area di confinamento ( $L$ ), rispettivamente. Inoltre vengono calcolate le distribuzioni per i parametri  $D_{12}$  e  $\gamma$  (coefficiente di diffusione anomala), come descritto nel paragrafo 1.4.1.

## 4. Risultati

### 4.1. Creazione di mutanti puntiformi e combinati della sequenza di ACP-TrkA

In questo lavoro di tesi, attraverso una reazione di mutagenesi sito-specifica, abbiamo deciso di generare mutanti puntiformi a livello di specifiche tirosine del dominio ICD di TrkA con lo scopo di andarne a valutare il significato dal punto di vista dell'espressione e del profilo di diffusività, in modo da capire quale dei suddetti residui sia responsabile dell'anomalo comportamento diffusivo riscontrato per il dead-kinase mutant di ACP-TrkA (vedi paragrafo 5 del capitolo 1). Dalla letteratura è noto che i residui di tirosina coinvolti nell'attivazione dell'attività chinastica e presenti quindi a livello del labbro di fosforilazione sono i seguenti: Y679, Y683, Y684; i residui invece coinvolti nel reclutamento di effettori intracellulari sono invece Y499, Y760 e Y794 (Cunningham M.E. et al., 1997); tutti questi residui sono elencati in Tabella 4.1. Le mutazioni indotte sono di tipo puntiforme e promuovono la conversione di un residuo di tirosina in uno di fenilalanina che, in quanto privo del gruppo funzionale OH impedisce la fosforilazione del recettore, senza andare al contempo ad alterare la struttura aromatica dello stesso; La conversione tirosina-fenilalanina comporta un cambio di base tra A e T, si passa quindi dalla sequenza TAC (Tyr) alla TTC (Phe). In un primo approccio abbiamo cominciato a generare mutanti puntiformi per ciascuna delle Tyr sopra citate, ottenendo però solo alcuni dei mutanti. Siamo presto passati, per semplificare il disegno sperimentale, alla progettazione di due mutanti combinati, che costituiscono il reale oggetto di studio in tale tesi:

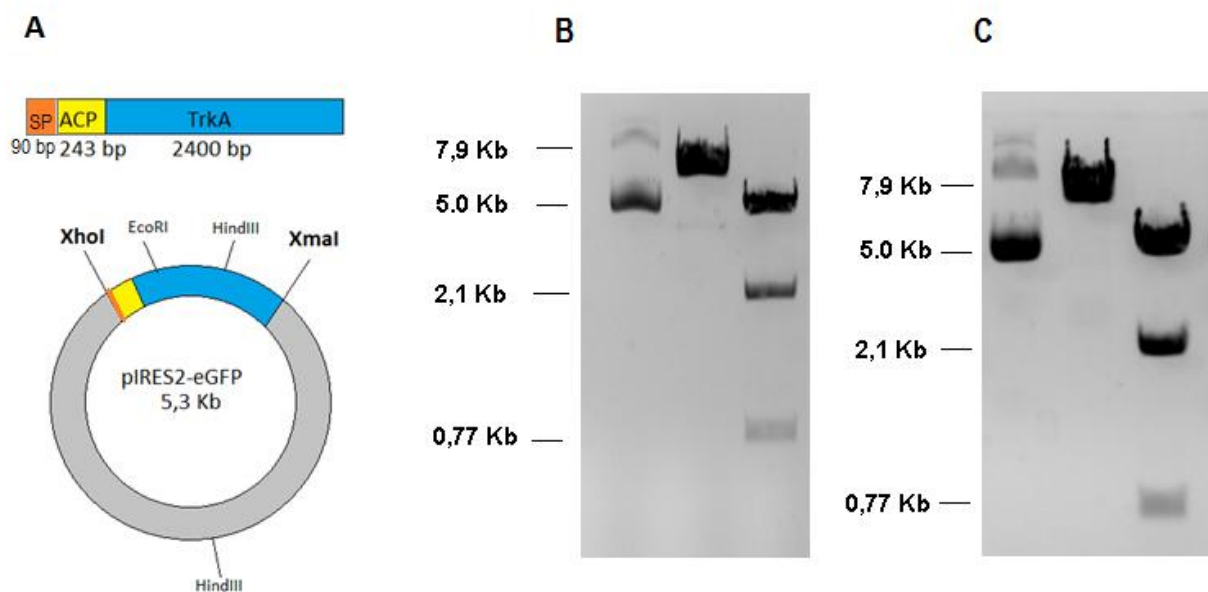
- *Kinase-Mutant (KM)*: ottenuto dalla mutagenesi dei residui coinvolti nell'attività chinastica, ovvero Y679, Y683, Y684;
- *Recruitment-Mutant (RM)*: ottenuto dalla mutagenesi dei residui coinvolti nel reclutamento di effettori intracellulari. I residui di tirosina coinvolti sono Y499, Y760 e Y794.

<b>Residuo</b>	<b>Funzione</b>
Y499	Reclutamento di GAB1 e SHC. Promuove l'attivazione della via di Ras
Y679	Residuo del labbro di fosforilazione. Attiva il processo di trans-fosforilazione indotta dal ligando.
Y683	Residuo del labbro di fosforilazione. Attiva il processo di trans-fosforilazione indotta dal ligando.
Y684	Residuo del labbro di fosforilazione. Attiva il processo di trans-fosforilazione indotta dal ligando.
Y760	Reclutamento di PI3K e attivazione della via di Akt.
Y794	Reclutamento di PLC-gamma e attivazione della via di PKC. Sito di ubiquitinazione.
Y704	Residuo coinvolto nello smistamento e endocitosi mediata da vescicole di clatrina.

**Tabella 4.1. Elenco dei residui di tirosina dell'ICD mutagenizzati e funzioni ad esse associate (dati tratti da Cunningham M.E. et al., 1997).**

I mutanti *KM* e *RM* sono stati ottenuti a partire dal cDNA di ratto relativo alla sequenza di TrkA, fusa con l'ACP-tag e clonato all'interno del plasmide pIRES2-EGFP, un vettore d'espressione in cellule di mammifero. In particolare, la sequenza di ACP-TrkA è stata clonata all'interno del sito multiplo di clonaggio (MCS) del vettore, compreso tra i siti di restrizione di XhoI e XmaI. La dimensione totale dell'intero plasmide è all'incirca di 7.9 Kb, di cui 5.3 Kb sono relative allo scheletro del plasmide, 243 bp al tag ACP e 2.4 Kb relative alla sequenza di TrkA.

Il DNA plasmidico dei mutanti *RM* e *KM* è stato confrontato con quello dell'ACP-TrkA *wt* attraverso digestioni a livello di specifici siti di restrizione ed è stato confrontato il profilo delle bande ottenute mediante un'elettroforesi su gel d'agarosio. Attraverso tale step è stato possibile dimostrare che i frammenti ottenuti dalla digestione dei 2 costrutti mostrano lo stesso profilo di bande ottenuto precedentemente per il costrutto ACP-TrkA *wt*, ottenendo così una conferma del fatto che l'induzione delle mutazioni puntiformi combinate non ha alterato drasticamente la sequenza di DNA. Sia per il *RM* che per il *KM* (Figura 4.1), sono stati confrontati i *pattern* di bande relativi al DNA non digerito, sottoposto a singola digestione con EcoRI e a doppia digestione con XhoI e HindIII. Gli enzimi EcoRI, XhoI e HindIII hanno siti di restrizione unici nel costrutto ACP-TrkA, mentre HindIII ha un sito di restrizione anche nella sequenza plasmidica.



**Figura 4.1. Immagine relativa al clonaggio di ACP-TrkA in pIRES2-eGFP e all'elettroforesi dei costrutti *RM* e *KM* sottoposti a digestione.** A) Il costrutto ACP-TrkA è ottenuto inserendo la sequenza del tag ACP tra la sequenza di TrkA codificante per il peptide segnale (SP) e la sequenza codificante per il resto della proteina. L'intero costrutto è stato clonato nell'MCS del plasmide pIRES2-eGFP, tra i siti di restrizione per gli enzimi XhoI e XmaI; in particolare il costrutto è stato inserito 6 basi dopo il sito di restrizione per XhoI, lasciando così il sito di restrizione per l'enzima. Sono mostrati anche i siti di restrizione per gli enzimi specifici usati nel processo di digestione. B) Elettroforesi del costrutto digerito di *RM*; C) Elettroforesi del costrutto digerito di *KM*.

Per entrambi i mutanti è possibile osservare che il profilo di bande è comparabile e soprattutto in linea con il pattern mostrato per il costrutto *wild-type*; in particolar modo nella prima corsia in entrambi i casi vi è la banda relativa al campione non digerito, che corre al PM di circa 5 Kb. Nella seconda corsia vi è invece la banda relativa alla singola digestione dei campioni con l'enzima EcoRI, che taglia il costrutto a livello di un unico sito di restrizione portando alla formazione di un plasmide linearizzato, che corre ad un PM di 7.9 Kb. Infine nella terza corsia è presente il pattern di bande relativo al campione sottoposto a digestione doppia con gli enzimi XhoI e HindIII; la banda più alta corre ad un peso molecolare (PM) di circa 5 Kb, quella intermedia ad un PM di circa 2.1 Kb e la più bassa ad un PM di 0.77 Kb.

Tra i vari mutanti puntiformi che abbiamo deciso di progettare, Y704F e Y499F hanno acquisito la mutazione indotta (Figura 4.2), mentre tutti gli altri hanno dato un'esito negativo per quanto riguarda le mutazioni a livello di singole basi. Le difficoltà di mutagenesi ci hanno portato a concentrarci su mutanti combinati di diversi residui di tirosina (*Kinase-Mutant* e *Recruitment-Mutant*) raggruppati in base alla loro differente funzione. Le sequenze dei costrutti ottenute dal sequenziamento sono state quindi allineate alla sequenza di ACP-TrkA, in modo tale da andare a verificare la presenza della mutazione indotta. Qui di seguito vengono riportati i risultati relativi ai sequenziamenti dei vari mutanti:

#### A) Mutante Y704F:

```

      2300   2310   2320   2330   2340   2350   2360   2370
CGGACCATGCTGCCCATCCGCTGGATGCCTCCAGAGAGCATCCTCTACCGCAAGTTCAGC
.....T.....

      2380   2390   2400   2410   2420   2430
ACCGAGAGTGATGTGTGGAGCTTCGGGGTGGTCTCTGGGAGATCTTCACCTATGGAAAG
.....

```

#### B) Mutante Y499F:

```

      1650   1660   1670   1680   1690   1700
- CCCTACACTTCATGACACTGGGTGGCAGTTCTCTTTCCCCTACTGAGGGCAAAGGCTCCG
- .....

      1710   1720   1730   1740   1750   1760
- GACTCCAGGGCCACATCATGGAGAACCCACAGTACTTCAGTGATACCTGTGTCCACCATA
- .....T.....

      1770   1780   1790   1800   1810   1820
- TCAAGCGCCAGGACATCATTCTCAAGTGGGAGCTAGGGGAGGGAGCCTTTGGAAAGGTCT
- .....

```

**C) Mutante Y760F/Y794F sul template Y499F:**

```
2510   2520   2530   2540   2550   2560
-   TGGCCCTCCTGATGTCTACGCCATCATGCGCGGGCTGCTGGCAGCGTGAGCCGCAACAGCGC
-   .....T.....

2570   2580   2590   2600   2610   2620
-   CTCAGCATGAAGGATGTGCACGCGCGGCTGCAGGCCTTGGCACAGGCGCCACCGAGTTAC
-   .....T.....

2630   2640
-   CTGGACGTTCTGGGCTAG
-   .....
```

**D) Mutazione Y679F/Y683F/Y684F:**

```
2220   2230   2240   2250   2260   2270
-   GCAACTGTCTGGTGGGTCAGGGACTAGTGGTCAAGATTGGAGACTTCGGCATGAGCAGGG
-   .....

2280   2290   2300   2310   2320   2330
-   ACATCTACAGCACAGACTACTACCGTGTGGGAGGTCGGACCATGCTGCCCATCCGCTGGA
-   .....T.....T.....T.....

2340   2350   2360   2370   2380   2390
-   TGCCTCCAGAGAGCATCCTCTACCGCAAGTTCAGCACCGAGAGTGATGTGTGGAGCTTCG
-   .....
```

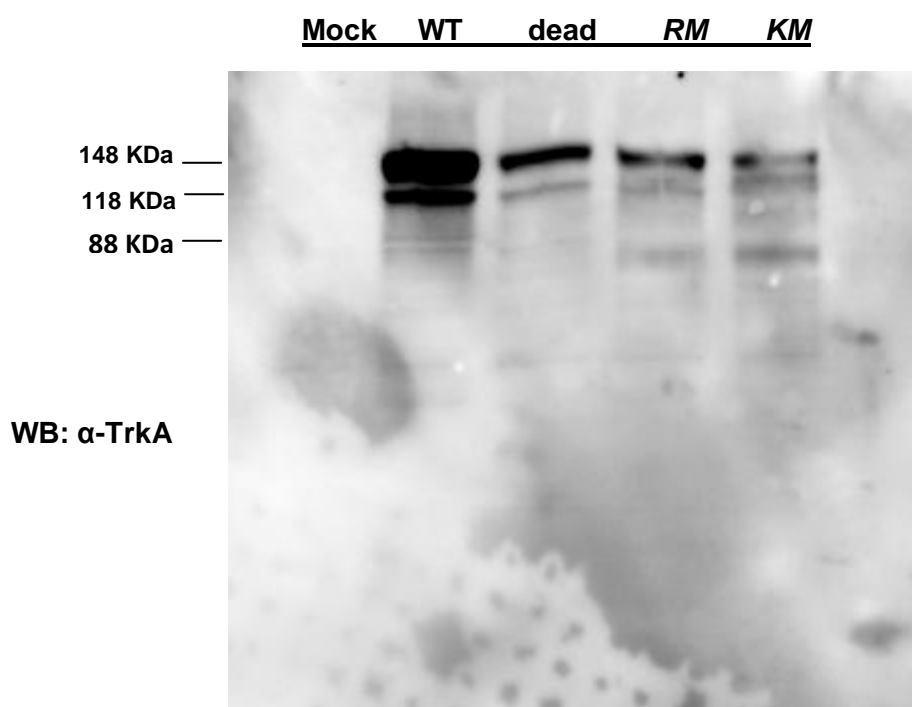
**Figura 4.2. Risultati del sequenziamento dei mutanti di ACP-TrkA.** I residui segnati in rosso sono quelli effettivamente mutati; la mutazione indotta è una conversione tirosina (TAC)-fenilalanina (TTC). A) Mutante Y704F (mutazione in posizione 2352 del cDNA); B) Mutante Y499F (mutazione in posizione 1742); C) Mutante doppio Y760F/Y794F (mutazioni rispettivamente in posizione 2525 e 2627); a partire dal mutante Y499F sono state indotte le mutazioni Y760F e Y794F; D) Mutante Y679F/Y683F/Y684F ovvero *RM* (mutazioni rispettivamente in posizione 2282, 2294 e in posizione 2297).

I risultati del sequenziamento hanno mostrato che la sostituzione tirosina-fenilalanina nella posizione da noi richiesta è stata indotta.

## 4.2. Validazione biochimica dei costrutti generati

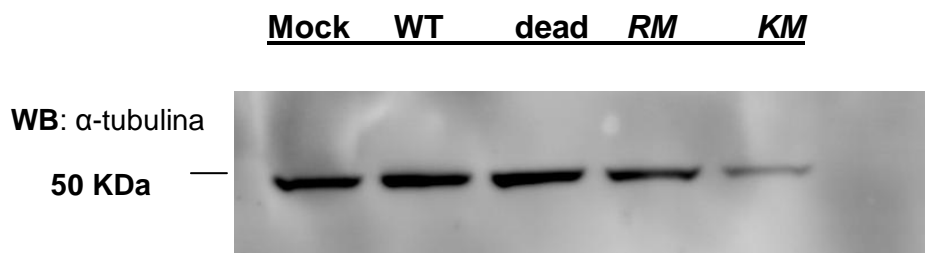
I mutanti *KM* e *RM* ottenuti mediante la reazione di mutagenesi sito-specifica, insieme ai costrutti TrkA wt e *dead-kinase* già disponibili in laboratorio sono stati fatti esprimere nella linea cellulare di neuroblastoma SH-SY5Y. Per andare a validare l'integrità a livello della struttura proteica dei 4 costrutti è stato effettuato un saggio *Western Blot* (WB).

L'analisi WB è stata effettuata con lo scopo di andare a verificare l'espressione dei costrutti TrkA wt, *dead-kinase*, *Recruitment-Mutant* e *Kinase-Mutant* nella linea cellulare di neuroblastoma umano. Prima di effettuare il WB i lisati proteici relativi ai 4 costrutti, ottenuti a partire dalle cellule trasfettate, sono stati quantificati col saggio di *Bradford*. A partire dai lisati proteici totali abbiamo quindi effettuato un'analisi WB, i cui risultati sono riportati in figura 4.3:



**Figura 4.3. Risultati dei Western Blot, partendo da 50µg di lisati cellulari trasfettati con i 4 costrutti.** In sequenza sono riportate le bande relative ai costrutti non trasfettato (Mock), ACP-TrkA wt, *dead-kinase*, *Recruitment-Mutant* e *Kinase-Mutant*, corrispondenti ai pesi di 148 KDa e 118 KDa.





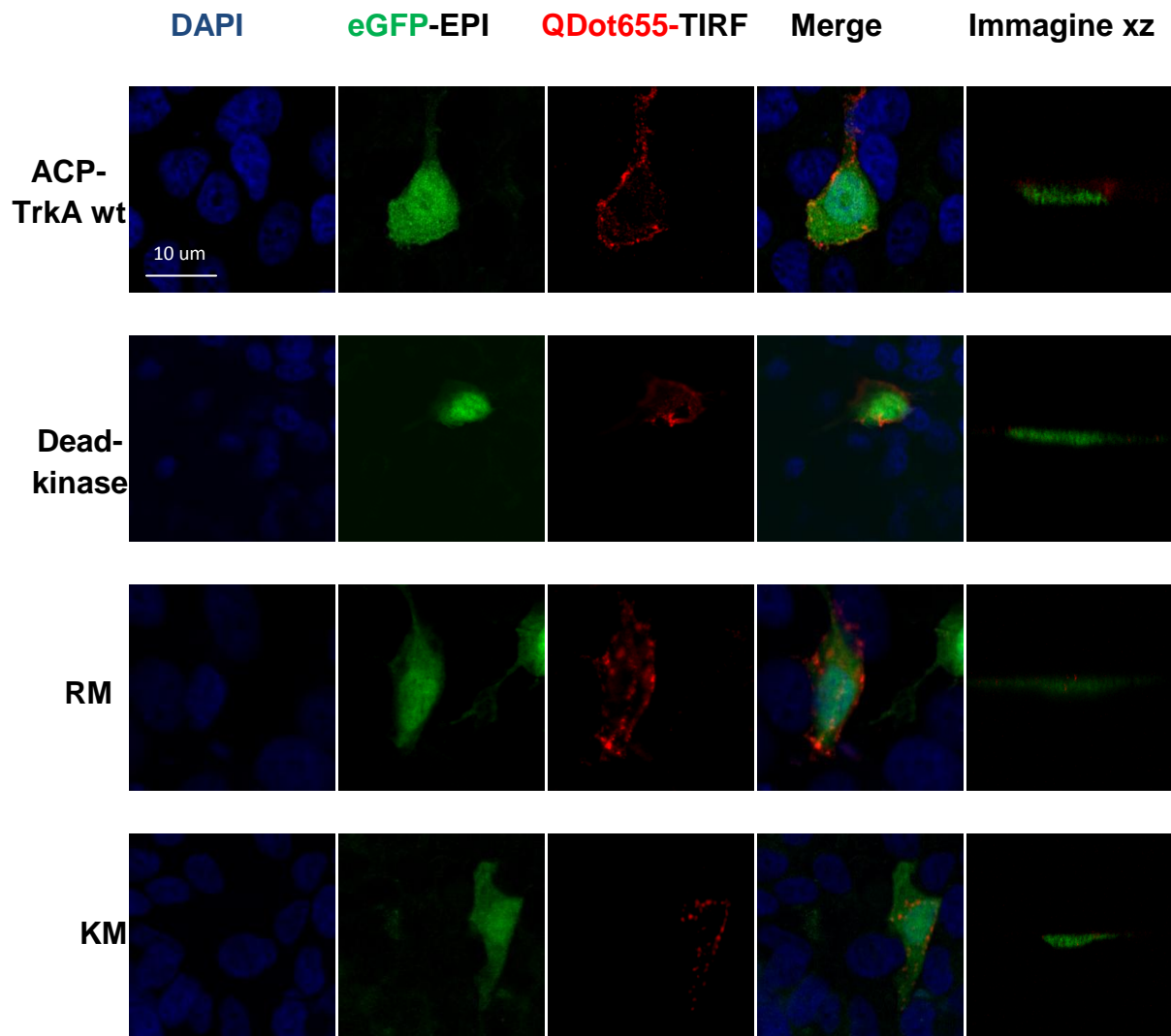
**Figura 4.4. Risultato del Western Blot contro l' α-tubulina.** Nell'ordine vengono mostrate le bande relative all' α-tubulina rispettivamente per i costrutti non trasfettati (Mock), ACP-TrkA wt, *dead-kinase*, *Recruitment-Mutant* e *Kinase-Mutant*.

La Figura 4.3 mette in risalto come per i 4 costrutti, il profilo di bande sia il medesimo, sebbene il costrutto di ACP-TrkA wt ma anche il costrutto *dead-kinase* sembrano essere maggiormente espressi in SH-SY5Y rispetto ad entrambi i mutanti; è possibile osservare, per ciascuno dei costrutti, la doppia banda relativa alla sequenza di ACP-TrkA. Possiamo osservare una banda più alta corrispondente ad un PM di 148 KDa (140 KDa relativi alla sequenza di TrkA e 8 KDa a quella di ACP), relativa alla proteina glicosilata correttamente traslocata in membrana, mentre la banda presente al PM di 118 KDa è relativa ad una forma di ACP-TrkA caratterizzata da un minor tasso di glicosilazione e probabilmente non esposta in membrana. Dalla figura è possibile osservare, in particolar modo per i campioni RM e KM, anche una banda al PM di 88 KDa, che potrebbe corrispondere alla proteina completamente non glicosilata. Come controllo di caricamento, cioè al fine di dimostrare se le quantità di lisato caricate nei pozzetti siano comparabili, è stato fatto sulla stessa membrana, anche un WB contro la tubulina, espressa costitutivamente a livello cellulare; il risultato emerso da tale controllo ha dimostrato come l'apparente minore espressione dei mutanti RM e KM, osservata nel saggio WB, possa in realtà essere imputabile anche ad una differenza della quantità di lisato totale caricata sul gel. Dai risultati del *Western Blot* possiamo concludere che sicuramente l'espressione dei costrutti in questa linea cellulare è compatibile con la natura complessa della proteina TrkA (recettore di membrana glicosilato con attività enzimatica), spesso caratterizzata da prodotti intermedi di glicosilazione; tuttavia tali prodotti sono equamente rappresentati in tutti e 4 i costrutti e comunque per ciascuno di

essi è possibile la rivelazione delle bande corrispondenti alla proteina intera, che è quella correttamente traslocata sulla membrana plasmatica, oggetto di nostro interesse. Quindi è verosimile concludere che le mutazioni indotte non abbiano comportato alterazioni della struttura proteica tali da compromettere l'espressione stessa della proteina.

### **4.3. Verifica della localizzazione recettoriale a livello di membrana**

I costrutti TrkA *wt*, *dead-kinase*, *Recruitment-Mutant* e *Kinase-Mutant* sono stati trasfettati nella linea cellulare SH-SY5Y; una volta espressi dalle cellule e traslocati in membrana i recettori sono stati biotinilati e successivamente marcati con una concentrazione di QDot circa pari a 10 nM. Siamo andati quindi a valutare la localizzazione della popolazione recettoriale a livello della membrana plasmatica grazie ad acquisizioni in microscopia confocale. Innanzitutto il riconoscimento delle cellule esprimenti i costrutti è stato possibile sfruttando la fluorescenza dell'eGFP del plasmide nel quale il costrutto ACP-TrkA è stato clonato. Il segnale relativo al nucleo delle cellule è individuato dal DAPI, mentre i recettori vengono osservati grazie alla marcatura selettiva con i QDot.



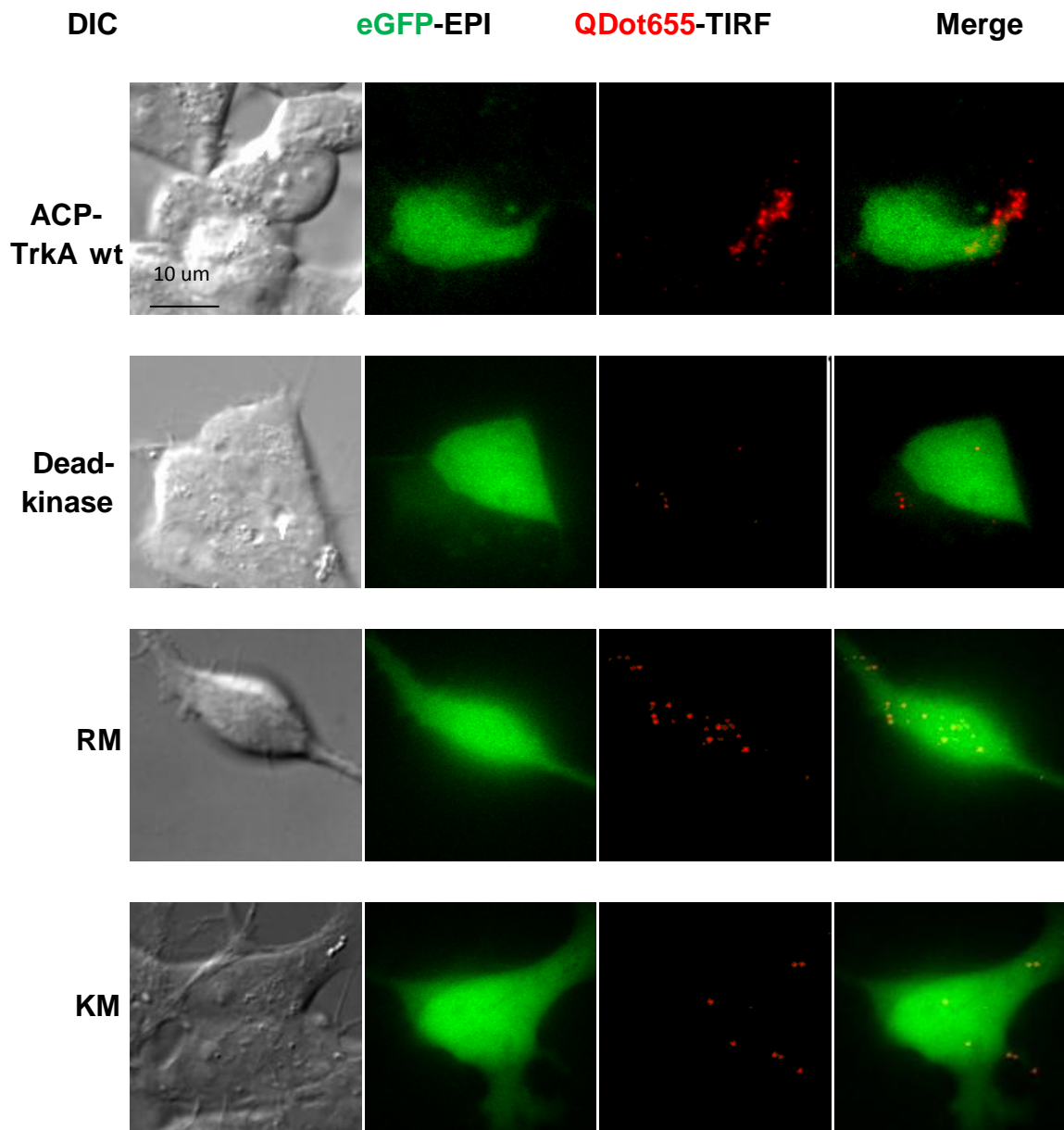
**Figura 4.5. Pannello relativo alla localizzazione delle popolazioni recettoriali dei 4 costrutti in membrana.** Il segnale verde è relativo alla GFP e marca il citoplasma; il segnale blu è relativo al DAPI e marca il nucleo; il segnale rosso è relativo ai QDot e marca i recettori in membrana; nella quarta colonna vengono mostrate le acquisizioni relative ai merge dei tre canali appena menzionati. Nella quinta colonna è mostrata solo la sovrapposizione del segnale della eGFP e dei QDot in una sezione ottica lungo il piano xz.

La Figura 4.5 offre una panoramica delle immagini acquisite in microscopia confocale relative alle cellule trasfettate con i 4 costrutti e fissate, in condizioni di assenza di ligando; attraverso questa analisi è stato possibile in prima istanza andare ad individuare le cellule trasfettate grazie al segnale dell'eGFP e successivamente i recettori grazie al segnale dei QDot. Da notare che le cellule sono state fissate immediatamente dopo la reazione di marcatura dei recettori ed in assenza di ligandi per TrkA, ricordando che tale procedimento permette di marcare solo i recettori correttamente traslocati in membrana. Dai risultati in Figura 4.5 si può notare che solo

nelle cellule trasfettate (che esprimono eGFP) è presente il segnale proveniente dai QDot, e questo avviene in tutti e 4 i campioni. Inoltre le immagini sono relative a recettori presenti sulla membrana plasmatica (nelle zone in cui i QDot sembrano colocalizzare con la eGFP nel citoplasma entrambi i segnali sono relativamente deboli, e quindi si tratta probabilmente di segnali relativi a fluorofori non perfettamente sul piano focale). Tali osservazioni sono state confermate da misure di sezioni ottiche nel piano xz, mostrate nell'ultima colonna di Figura 4.5 in cui è possibile osservare che lo spessore delle cellule (indicato dal segnale verde dell'eGFP) è solitamente abbastanza piccolo, cosa che rende difficile trovare sezioni xy che diano buone immagini confocali; ad ogni modo la relativa posizione delle molecole marcate in rosso dimostra come i recettori marcati con QDot vadano effettivamente a localizzarsi tutti intorno alla membrana plasmatica.

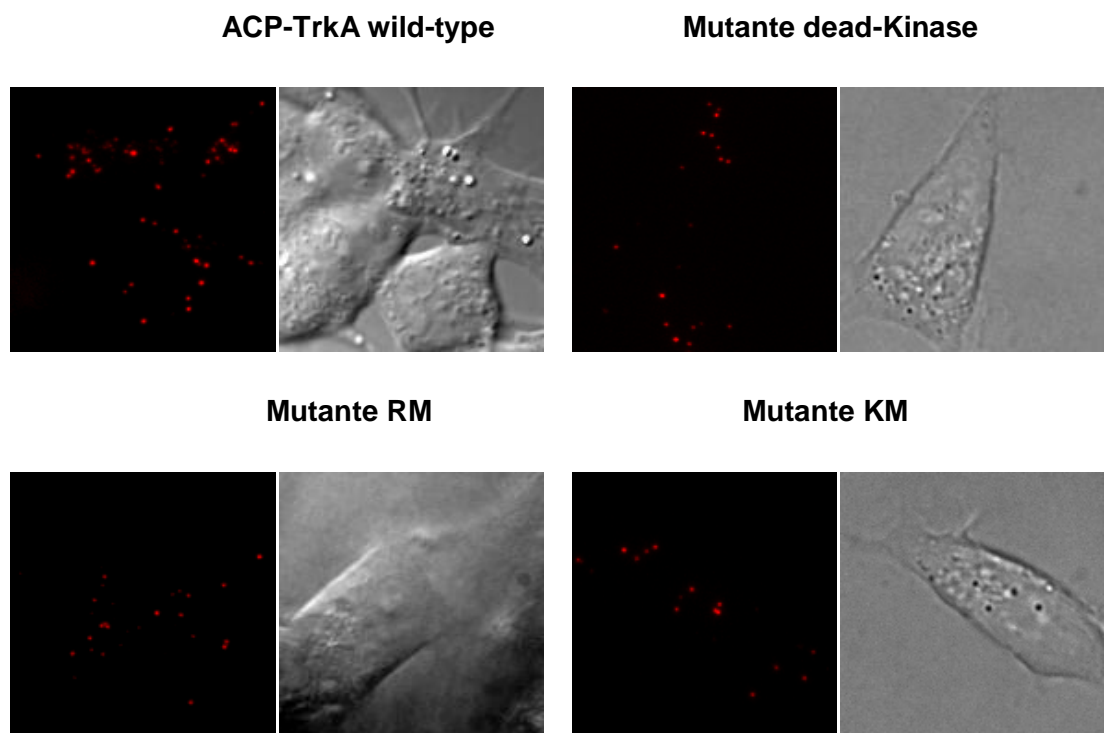
## 4.4. Analisi a singola molecola dei costrutti

Allo scopo di andare a marcare singole molecole di ACP-TrkA in membrana, in modo tale da monitorarne le traiettorie, la concentrazione di QDot per marcare i recettori viene abbassata al valore di circa 2nM e l'acquisizione di immagini a livello della membrana posta a livello dell'interfaccia di acquisizione viene effettuata con l'ausilio della microscopia TIRF. È importante che la densità dei recettori marcati a livello di membrana sia sufficientemente bassa se si intendono effettuare analisi SPT; inoltre scegliendo cellule con bassa espressione di recettori, è possibile evitare fenomeni di cross-fosforilazione indotta da domini tirosin-chinasici di recettori vicini (Marchetti L. et al., 2013). I 4 costrutti vengono fatti esprimere nella linea SH-SY5Y e la popolazione recettoriale traslocata in membrana viene biotinilata, sfruttando la presenza del tag ACP fuso all'ECD del recettore. A questo punto la biotina può essere legata da QDot655 streptavidinati. Attraverso acquisizioni in microscopia TIRF e successiva analisi SPT siamo andati a valutare la mobilità di ACP-TrkA wt e dei mutanti *dead-kinase*, *Recruitment-Mutant* e *Kinase-mutant* in condizioni di assenza di ligando. Come mostrato nella Figura 4.6, per ogni costrutto sono state acquisite immagini in microscopia a trasmissione DIC (*differential interference contrast-contrasto differenziale interferenziale*), in microscopia ad epifluorescenza per individuare il segnale dell' eGFP e immagini in microscopia TIRF per monitorare i QDot.



**Figura 4.6. Pannello relativo alla distribuzione dei 4 costrutti marcati a livello della membrana basale.** In grigio vengono mostrate le acquisizioni in microscopia a trasmissione DIC; il canale del verde è relativo all'eGFP ed è acquisito in epifluorescenza; il canale del rosso è quello relativo ai QDot a livello della membrana basale della linea cellulare di SH-SY5Y ed è acquisito in TIRFm; infine vengono mostrate immagini derivate dalla sovrapposizione dei canali della eGFP e dei QDot (*merge*).

Con il supporto della microscopia TIRF è stato possibile monitorare, attraverso filmati della durata di 3000 fotogrammi campionati ogni 21 ms, il movimento di singoli recettori di membrana marcati con QDot655 a livello della membrana adesa al supporto in cellule vive; tali filmati forniranno la base per la successiva analisi delle traiettorie.

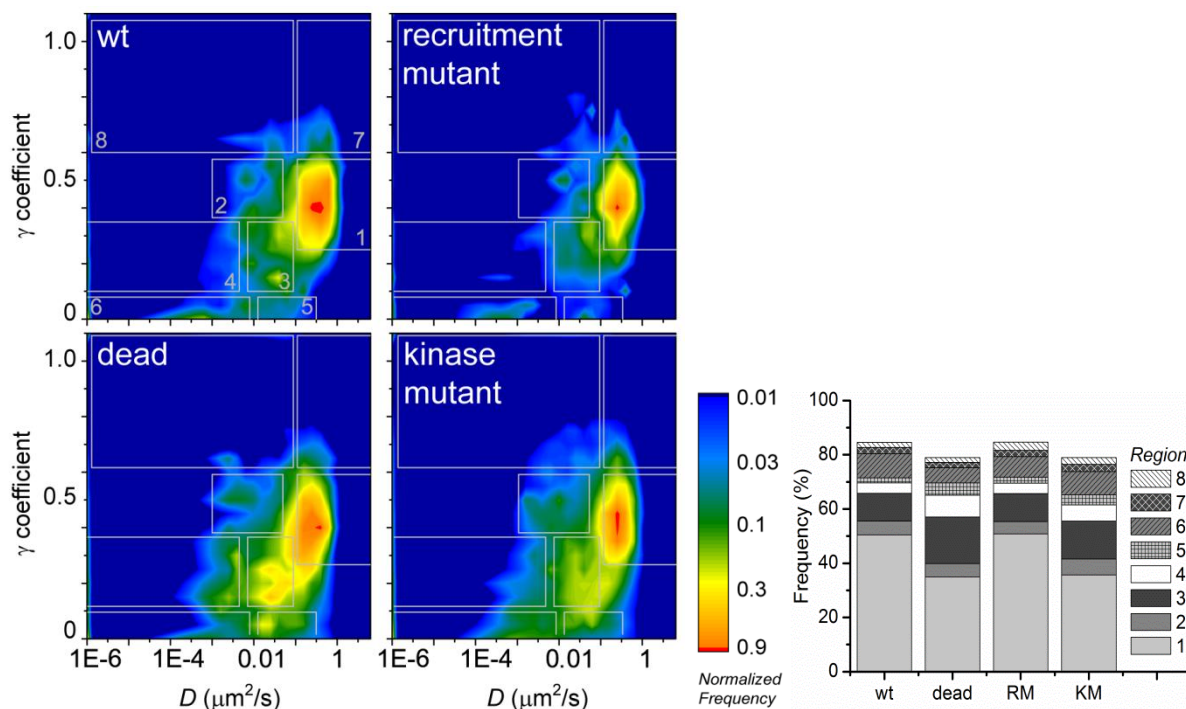


**Figura 4.7.** Immagini di cellule SHSY5Y con TrkA marcato con QDot655 acquisite in microscopia DIC e TIRF. Sono riportati, per i 4 campioni, il primo fotogramma di un filmato acquisito in microscopia TIRF e la corrispondente immagine mostrata in microscopia DIC.

## 4.5. Analisi delle traiettorie

Una volta ottenuti i filmati relativi ai 4 costrutti mediante acquisizioni in microscopia TIRF, questi vengono processati mediante il software *Imaris*, il quale trova la posizione degli spot relativi ai singoli recettori in ogni fotogramma e li collega in una serie di traiettorie. Successivamente è possibile (eventualmente) dividere tali traiettorie in sottotraiettorie e ricavare i parametri dinamici relativi a queste, grazie al supporto di specifici algoritmi implementati utilizzando il software *Matlab*. Dai dati relativi alle traiettorie è stato possibile ricavare informazioni sia sul tipo di moto dei recettori, sia su parametri specifici relativi alla loro dinamica. I dati così ricavati sono stati riportati su mappe rappresentanti la distribuzione 2D di due parametri specifici per il comportamento di qualsiasi traiettoria, ovvero il coefficiente di diffusività a tempi brevi  $D_{12}$  e il coefficiente di diffusione anomala  $\gamma$ , il quale definisce il tipo di moto dalla traiettoria (vedi paragrafo 1.4.1). Nello specifico ricordiamo che valori di  $\gamma$  vicini a 0.5 sono tipici di particelle che diffondono liberamente con un moto Browniano, valori di

$\gamma < 0.5$  caratterizzano un moto di tipo confinato, mentre valori di  $\gamma > 0.5$  sono caratteristici di particelle con un moto almeno parzialmente direzionato. Nel seguente pannello sono messe a confronto le distribuzioni  $D_{12}-\gamma$  dei 4 costrutti, in condizioni di assenza di ligando: TrkA wt, mutante *dead-kinase*, *Recruitment-Mutant* e *Kinase-Mutant*.



**Figura 4.8. Confronto delle distribuzioni sperimentali per i parametri  $D_{12}$  ( $D$ ) e  $\gamma$  ( $\gamma$  coefficient) trovati per ACP-TrkA wt, *dead-kinase*, *Kinase-Mutant* e *Recruitment-Mutant* in assenza di ligando.** I riquadri sulla sinistra sono relativi ai costrutti TrkA wt e *dead-kinase* mentre i riquadri al centro sono relativi ai costrutti *Kinase-mutant* e *Recruitment-Mutant*. Regioni delimitate da una linea grigia e numerate da 1 a 8 nel pannello A, corrispondono a differenti tipi di moto del recettore sulla membrana; il peso relativo delle traiettorie presenti in ciascuna regione è quantificato e riportato nel grafico in basso a destra (vedi paragrafo 1.4.1 e didascalia della Figura 1.10). I grafici derivano dall'unione delle traiettorie e sottotraiettorie accumulate in 2 o 3 esperimenti indipendenti effettuati per ciascuno dei costrutti. Il numero totale di traiettorie analizzate è rispettivamente:  $n=2153$  (wt);  $n=2645$  (dead);  $n=838$  (RM);  $n=4656$  (KM).

In prima istanza andiamo a confrontare l'esito dei nuovi esperimenti condotti sulla diffusività di TrkA wt e del mutante *dead-kinase* con quello degli analoghi esperimenti precedentemente condotti (Figura 1.13). Come è possibile osservare dal confronto fra pannelli A e C di Figura 1.13 ed i pannelli di sinistra di Figura 4.8, oltre che dai rispettivi istogrammi a barre sovrapposte, i profili di mobilità tra le due serie di esperimenti sono



abbastanza comparabili sia per TrkA wt sia per il mutante *dead-kinase*, anche se non del tutto identici. Riteniamo che la causa più probabile di questa discrepanza sia il fatto che nei due set di misure sperimentali sono state usate 2 fonti diverse di cellule SH-SY5Y e ci potrebbero essere dei lievi cambiamenti nella mobilità di membrana del recettore nei due casi. Inoltre negli esperimenti da me condotti vediamo anche un popolamento dell'area 6, ascrivibile almeno in parte a QDot adesi aspecificamente al vetrino, probabilmente rimasti perché i QDot non sono stati sufficientemente lavati alla fine del processo di marcatura. Nonostante questo i recettori si muovono comunque con un coefficiente di diffusività  $D$  alto e sono caratterizzate per lo più da un moto di tipo Browniano. Per quanto riguarda il mutante *dead-kinase* possiamo invece osservare che il comportamento rallentato rispetto al wt è confermato. Passiamo in rassegna ora i risultati relativi ai due nuovi mutanti generati: *Kinase-Mutant* e *Recruitment-Mutant*. Dalla mappa relativa al *Recruitment-Mutant* è possibile evincere come il suo profilo di diffusività sia molto simile a quello del recettore TrkA wt, in particolar modo le popolazioni a maggior frequenza, anche in questo caso, presentano un coefficiente di diffusività relativamente alto e sono caratterizzate da un tipo di moto Browniano. Al contrario, per quanto riguarda il mutante *Kinase-Mutant* possiamo osservare come il profilo di diffusività è molto più simile, seppur non uguale, a quello del mutante *dead-kinase*. Il recettore mutato a livello del proprio dominio d'attività chinasi appare infatti rallentato, rispetto al mutante *Recruitment*. Nonostante siano presenti popolazioni recettoriali a livello di aree a coefficiente di diffusività alto, in questo caso troviamo anche il recettore in regioni caratterizzate da un moto molto più rallentato e confinato. Ciò ci ha fornito la base per andare a formulare la nostra ipotesi; ricordiamo infatti che, in condizioni di assenza di ligando, il TrkA wt è caratterizzato da un moto molto rapido e di tipo Browniano, il mutante *dead-kinase* invece nelle stesse condizioni va parzialmente incontro ad una sorta di blocco, imputabile al fatto che si possa trovare a livello di precursori di vescicole deputate all'internalizzazione. Dagli esperimenti condotti nel presente lavoro di tesi è possibile quindi ipotizzare che, in condizioni di assenza di ligando, la mutazione dei residui Y679/Y683/Y684 ovvero quelli responsabili dell'attività chinasi del recettore TrkA, inducano un comportamento del tutto analogo a quello riscontrato per il mutante *dead-kinase*. Dunque l'attività chinasi sembrerebbe avere un ruolo determinante sulla diffusività recettoriale a livello della membrana plasmatica della cellula e nella fattispecie sembrerebbe andare a compromettere la libertà di movimento del recettore, rallentandolo.

## 5. Discussione e conclusioni

Il presente lavoro di tesi, si inserisce all'interno di una linea di ricerca preesistente, con lo scopo di andare ad indagare il comportamento dinamico anomalo del mutante *dead-kinase* ottenuto, a partire dalla sequenza di ACP-TrkA, inducendo la mutazione K547R. Tale mutazione ha l'effetto di andare a modificare il sito di legame per l'ATP a livello del dominio intracellulare del recettore, inibendo quindi tutti i processi di fosforilazione delle tirosine coinvolte sia nell'attività chinastica che nel reclutamento di effettori intracellulari. Il mutante *dead-kinase*, in condizioni di assenza di ligando, mostra un profilo di diffusività caratterizzato da un moto più rallentato associato all'aumento di traiettorie confinate, se confrontato con quello dell'ACP-TrkA *wt*. Per andare a comprendere la causa di tale comportamento dinamico abbiamo generato due mutanti combinati, *Recruitment-Mutant* e *Kinase-Mutant*, attraverso la mutagenesi dei residui di tirosina coinvolti rispettivamente nel reclutamento di effettori intracellulari e nell'attività chinastica; il sequenziamento dei due mutanti ha permesso di appurare che le mutazioni desiderate fossero state realmente indotte. Inoltre grazie al saggio biochimico di Western Blot abbiamo verificato che i costrutti ACP-TrkA *wt*, *dead-kinase*, *RM* e *KM* si esprimono in maniera paragonabile nella linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y. Attraverso la coniugazione della biotina alle molecole di recettore e la successiva marcatura con QDot streptavidinati è stato possibile effettuare acquisizioni in microscopia confocale su preparati fissati di cellule SH-SY5Y, che hanno dimostrato che i quattro costrutti, in condizioni di assenza di ligando, possono tutti essere marcati sulla membrana plasmatica. Abbassando la concentrazione di QDot, pur sfruttando la medesima strategia di marcatura, è stato possibile marcare le singole molecole di recettore e seguire la loro dinamica attraverso acquisizioni in microscopia TIRF; i filmati risultanti dall'analisi a singola molecola hanno permesso di ottenere, attraverso analisi SPT, informazioni sul tipo di moto dei diversi costrutti e sui parametri quantitativi che lo caratterizzano. Dalle mappe di distribuzione D- $\gamma$  è stato possibile confrontare il profilo di diffusività dei quattro costrutti in esame e trarre conclusioni in proposito; i profili di mobilità, illustrati attraverso le mappe, dei costrutti ACP-TrkA *wt* e del mutante *dead-kinase* sono stati prima confrontati con quelli ottenuti precedentemente presso i

laboratori NEST (Figura 1.13), restituendo risultati paragonabili, successivamente sono stati valutati i mutanti *RM* e *KM*. Il *Recruitment-Mutant* ha un profilo di diffusività confrontabile con quello del TrkA *wt* in quanto per lo più caratterizzato da un moto di tipo Browniano e ad alto coefficiente di diffusività, almeno per le popolazioni recettoriali presenti con maggior frequenza. Per quanto riguarda il *Kinase-Mutant*, abbiamo visto innanzitutto che tale mutante ha un profilo di diffusività quasi sovrapponibile a quello mostrato dal recettore TrkA *wt* in presenza dell'inibitore dell'attività chinasi K252a (Figura 1.10), il che ci indica che l'effetto sulla diffusività recettoriale è il medesimo, sia che l'inibizione sia indotta a livello della struttura del recettore, sia che venga indotta attraverso un'azione farmacologica. Per quanto riguarda invece il confronto con il TrkA *wt* e con il *dead-kinase*, il mutante *Kinase-Mutant* sembra avere un profilo di mobilità comparabile a quello del mutante *dead-kinase*, caratterizzato cioè da un moto molto più rallentato, dovuto ad un aumento delle popolazioni di recettori immobili. Da tali risultati è possibile ipotizzare che le tirosine dell'ICD di TrkA coinvolte nel comportamento anomalo del *dead-kinase*, almeno in condizioni di assenza di ligando, potrebbero essere quelle deputate all'attività chinasi del recettore e localizzate a livello del labbro di fosforilazione, ovvero Y679, Y683 e Y784. Sarà interessante valutare eventuali cambiamenti di diffusività dei 4 mutanti in risposta a diversi stimoli, come l'aggiunta di neurotrofina al mezzo di coltura o il trattamento con specifiche droghe in grado di alterare componenti strutturali della membrana o del macchinario di endocitosi. Sarà altresì interessante andare a valutare lo stato oligomerico maggiormente rappresentato in membrana per ciascuno dei 4 costrutti, e se questo dipende dai trattamenti sopra menzionati. Infine, mediante creazione di costrutti mutanti puntiformi Y679F, Y683F e Y784F, ed eventualmente di combinazioni a due a due delle stesse, sarà possibile vedere se basta che una sola o almeno due di queste tirosine sia compromessa per causare l'anomalo comportamento diffusivo del recettore, e se uno di questi 3 residui in particolare è maggiormente coinvolto in questo specifico comportamento dinamico.

# Acronimi

NGF, *Nerve Growth Factor*

BDNF, *Brain-Derived Neurotrophic Factor*

NT, *Neurotrofina/e*

NT-3, *Neurotrophin-3*

NT-4, *Neurotrophin-4*

Trk (A, B, C), *Tropomyosin Receptor Kinase (A, B, C)*

P75<sup>NTR</sup>, *P75 Neurotrophin Receptor*

TK, *Tyrosine-kinase*

TKD, *Tyrosine-kinase Domain*

ECD, *ExtraCellular Domain*

ICD, *IntraCellular Domain*

TM, *Transmembranal domain*

TNFR, *Tumor Necrosis Factor Receptor*

Fc, *Frammento cristallizabile*

UTR, *UnTranslated Region*

CRD, *Cysteine-Rich Domain*

LRR, *Leuchine-Rich Domain*

CD, *Chopper Domain*

IgL-D, *Immunoglobuline-like Domain*

JM, *Juxtamembranal Domain*

PLC-gamma, *Phospholipase-C-Gamma*

PI3K, *Phosphatidylinositol-3 Kinase*

DAG, *Diacylglycerol*

IP3, *Inositol Triphosphate*

MAPKs, *Mitogen-Activated Proteins*

PPT, *Phosphopantheteinyltransferases*

QDot, *Quantum Dot*

TIRF(M), *Total Internal Reflection Fluorescence (Microscopy)*

MSD, *Mean Square Displacement*

eGFP, *enhanced Green Fluorescent Protein*

DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

FBS, *Fetal Bovine Serum*

PBS, *Phosphate Buffered Saline*

RPM, *Revolutions Per Minute*

RT, *Room Temperature*

GFP, *Green Fluorescent Protein e*

PFA, *Paraformaldehyde*

BSA, *Bovine Serum Albumin*

DAPI, *4',6-diamidino-2-phenylindole*

ON, *Over Night*

WB, *Western Blot*

TBST, *Tris-Buffered Saline/Tween-20*

CCD, *charge coupled device*

ROI, *Region Of Interest*

DIC, *Differential Interference Contrast*

IP, Immunoprecipitazione

SPT, *Single Particle Tracking*

SMI, *Single Particle Imaging*

# Bibliografia

**Aboukassim T**, Tong X.K, Tse YC, Wong T.P, Woo S.B, Neet KE, Brahimi F, Hamel E, Saragovi H.U. (2011) Ligand-dependent TrkA activity in brain differentially affects spatial learning and long-term memory. *Molecular Pharmacology*; 80(3):498-508.

**Akhmanova A**, Steinmetz M.O. (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*; 9(4):309-22.

**Arevalo J.C**, Conde B, Hempstead B.I, Chao M.V, Martín-Zanca D, Pérez P. (2001) A novel mutation within the extracellular domain of TrkA causes constitutive receptor activation. *Oncogene*; 20(10):1229-34.

**Arévalo J.C**, Waite J, Rajagopal R, Beyna M, Chen Z.Y, Lee F.S, Chao M.V. (2006) Cell survival through Trk neurotrophin receptors is differentially regulated by ubiquitination. *Neuron*; 50(4):549-59.

**Barker P.A**, Lomen-Hoerth C, Gensch E.M, Meakin S.O, Glass D.J, Shooter E.M.(1993) Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *Journal of Biological Chemistry*; 268(20):15150-7.

**Bibel M**, Hoppe E, Barde Y.A. (1999) Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO Journal*; 18(3): 616–622.

**Bothwell M**. (1995) Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annual Review of Neuroscience*; 18:223-53.

**Brandenburg B**, Zhuang X. (2007) Virus trafficking-learning from single-virus tracking. *Nature Review Microbiology*; 5(3):197-208.

**Callegari A**, Luin S, Marchetti L, Duci A, Cattaneo A, Beltram F. (2012) Single particle tracking of acyl carrier protein (ACP)-tagged TrkA receptors in PC12nnr5 cells. *Journal of Neuroscience Methods*; 204(1):82-6.

**Casaletto J.B**, McClatchey A.I.(2012) Spatial regulation of receptor tyrosine kinases in development and cancer. *Nature Review Cancer*; 12(6):387-400.

**Cella Zancacchi F**, Lavagnino Z, Perrone Donnorso M, Del Bue A, Furia L, Faretta M, Diaspro A. (2011) Live-cell 3D super-resolution imaging in thick biological samples. *Nature Methods*; 8(12):1047-9.

**Chao M.V.** (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature Review Neuroscience*; 4(4):299-309.

**Chao M.V**, Rajagopal R, Lee F.S.(2006) Neurotrophin signalling in health and disease. *Clinical Science*; 110(2):167-73.

**Chen Z**, Cornish V.W, Min W. (2013) Chemical tags: inspiration for advanced imaging techniques. *Current Opinion in Chemical Biology*; 17(4):637-43.

**Cheung E.C**, Slack R.S. (2004) Emerging role for ERK as a key regulator of neuronal apoptosis. *Science Signalling*. 2004(251):PE45.

**Coppola V**, Barrick C.A. Southon E.A, Celeste A,Wang K, Chen B, Haddad EB, Yin J, Nussenzweig A, Subramaniam A, Tessarollo L. (2004) Ablation of TrkA function in the immune system causes B cell abnormalities. *Development*; 131(20):5185-95.

**Cui B**, Wu C, Chen L, Ramirez A, Bearer E.L, Li WP, Mobley W.C, Chu S. (2007) One at a time, live tracking of NGF axonal transport using quantum dots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 104(34):13666-71.



**Cunningham M.E**, Stephens R.M, Kaplan D.R, Greene L.A. (1997) Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth factor receptor. *Journal of Biological Chemistry*; 272(16):10957-67.

**Fernández-Suárez M**, Ting A.Y. (2008) Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nature Review Molecular Cell Biology*; 9(12):929-43.

**Freund-Michel V**, Bertrand C, Frossard N. (2006) TrkA signalling pathways in human airway smooth muscle cell proliferation. *Cell signaling*; 18(5):621-7.

**Freund-Michel V**, Frossard N. (2006) Nerve growth factor (NGF): new role for a neuronal mediator in the airways. *Pathologie Biologie*; 54(3):122-4.

**García-Sáez A.J**, Schwille P.(2007) Single molecule techniques for the study of membrane proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 76(2):257-66.

**Geetha T**, Jiang J, Wooten M.V. (2005) Lysine 63 Polyubiquitination of the Nerve Growth Factor Receptor TrkA Directs Internalization and Signaling. *Cell Press*; 20(2):301-12.

**Geetha T**, Wooten M.V. (2008) TrkA Receptor Endolysosomal Degradation is Both Ubiquitin and Proteasome Dependent. *Traffic*; 9(7):1146-56.

**Gimm O**, Greco A, Hoang-Vu C, Dralle H, Pierotti M.A, Eng C. (1999) Mutation analysis reveals novel sequence variants in NTRK1 in sporadic human medullary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*; 84: 2784-2787.

**Ginty D.D**, Segal R.A. (2002).Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. *Annual Review of Neuroscience*; 12(3):268-74.

**Greene L.A**, Shooter E.M (1980) The nerve growth factor: biochemistry, synthesis, and mechanism of action. *Annual Review of Neuroscience*; 3:353-402.

**Greco A**, Villa R, Pierotti M.A. (1996) Genomic organization of the human NTRK1 gene. *Oncogene*; 13(11):2463-6.

**Greco A**, Villa R, Tubino B, Romano L, Penso D, Pierotti M.A. (1999) A novel NTRK1 mutation associated with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *The American Journal of Human Genetics*; 64(4): 1207–1210.

**Hell S.W.** (2003) Toward fluorescence nanoscopy. *Nature Biotechnology*; 21(11):1347-55.

**Hempstead B.L**, Martin-Zanca D, Kaplan D.R, Parada L.F, Chao M.V. (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the *trk* proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature*. 350(6320):678-83.

**Hepburn L**, Prajsnar T.K., Klapholz C, Moreno P, Loynes C.A, Ogryzko N.V, Brown K, Schiebler M, Hegyi K, Antrobus R, Hammond K.L, Connolly J. (2014) A Spaetzle-like role for nerve growth factor-beta in vertebrate immunity to *Staphylococcus aureus*. *Science*; 346(6209): 641–646.

**Hibino K**, Hiroshima M, Takahashi M, Sako Y. (2009) Single-molecule imaging of fluorescent proteins expressed in living cells. *Method in Molecular Biology*; 544:451-60.

**Hinner M.J**, Johnsson K. (2010) How to obtain labeled proteins and what to do with them. *Current Opinion Biotechnology*; 21(6):766-76.

**Ho R**, Minturn J.E, Simpson A.M, Iyer R, Light J.E, Evans A.E, Brodeur G.M. (2011) The effect of P75 on Trk receptors in neuroblastomas. *Cancer Letters*; 305(1):76-85.

**Huang E.J**, Reichardt L.F (2003) TRK RECEPTORS: ROLES IN NEURONAL SIGNAL TRANSDUCTION. *Annual Review of Biochemistry*; 72:609-42.

**Klein R**, Jing S.Q, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M (1991).The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell*; 65(1):189-97.

**Inagaki N**, Thoenen H, Lindholm D. (1995) TrkA Tyrosine Residues Involved in NGF-induced Neurite Outgrowth of PC12 Cells. *European Journal of Neuroscience*. 7(6):1125-33.

**Indo Y**, Tsuruta M, Hayashida Y, Karim M.A, Ohta K, Kawano T, Mitsubuchi H, Tonoki H, Awaya Y, Matsuda I. (1996) Mutations in the TrkA /NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Nature Genetics*; 13(4):485-8.

**Indo Y**, Mardy S, Tsuruta M, Karim M.A, Matsuda I.(2007) Structure and organization of the human TRKA gene encoding a high affinity receptor for nerve growth factor. *Japanese Journal of Human Genetics*; 42(2):343-51.

**Lambiase A**, Merlo D, Mollinari C, Bonini P, Rinaldi A. M, D'Amato M, Micera A, Coassin M, Rama P, Bonini S, Garaci E. (2005) Molecular basis for keratoconus: lack of TrkA expression and its transcriptional repression by Sp3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 102(46):16795-800.

**Levi-Montalcini R**. (1987)The nerve growth factor 35 years later. *Science*; 237(4819):1154-62.

**Longo M.F**, Massa S.M. (2013) Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: a strategy for the treatment of neurological disease. *Nature Reviews Drug Discovery*; 12(7):507-25.

**Mardy S**, Miura Y, Endo F, Matsuda I, Indo Y. (2001) Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): effect of TRKA (NTRK1) missense mutations on autophosphorylation of the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. *Human Molecular Genetics*; 10(3):179-88.

**Marchetti L**, Callegari A, Luin S, Signore G, Viegi A, Beltram F, Cattaneo A. (2013) Ligand signature in the membrane dynamics of single TrkA receptor molecules. *Journal of Cell Science*; 126(Pt 19):4445-56.

**Marchetti L**, De Nadai T, Bonsignore F, Calvello M, Signore G, Viegi A, Beltram F, Luin S, Cattaneo A. (2014). Site-Specific Labeling of Neurotrophins and Their Receptors via Short and Versatile Peptide Tags. *PLOS ONE*; 9(11):e113708.

**Marchetti L**, Luin S, Bonsignore F, De Nadai T, Beltram F, Cattaneo A. (2015) Ligand-Induced Dynamics of Neurotrophin Receptors Investigated by Single-Molecule Imaging Approaches. *International Journal of Molecular Science*; 16(1):1949-79.

**Martin-Zanca D**, Hughes S.H, Barbacid M. (1986) A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature*; 319(6056):743-8.

**Matusica D**, Skeldal S, Sykes A.M, Palstra N, Sharma A, Coulson E.J. (2013) An intracellular domain fragment of the p75 neurotrophin receptor (p75(NTR)) enhances tropomyosin receptor kinase A (TrkA) receptor function. *The Journal of Biological Chemistry*; 288(16):11144-54.

**Miranda C**, Selleri S, Pierotti M. A, Greco A. (2002) The M581V mutation, associated with a mild form of congenital insensitivity to pain with anhidrosis, causes partial inactivation of the NTRK1 receptor. *Journal of Investigative Dermatology*; 119(4):978-9.

**Miura Y**, Mardy S, Awaya Y, Nihei K, Endo F, Matsuda I, Indo Y. (2000) Mutation and polymorphism analysis of the TRKA (NTRK1) gene encoding a high-affinity receptor for nerve growth factor in congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) families. *Human Genetics*; 106(1):116-24.

**Morisaki T**, Müller W.G, Golob N, Mazza D, McNally J.G. (2014). Single-molecule analysis of transcription factor binding at transcription sites in live cells. *Nature Communications*; 5:4456.

**Mulloy J.C**, Jankovic V, Wunderlich M, Delwel R, Cammenga J, Krejci O, Zhao H, Valk P. J. M, Lowenberg B, Nimer S.D. (2005) AML1-ETO fusion protein up-regulates TRKA mRNA expression in human CD34(+) cells, allowing nerve growth factor-induced expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 102(11):4016-21.

**Negishi M**, Katoh H. (2002) Rho family GTPases as key regulators for neuronal network formation. *Journal of Biochemistry*. 132(2):157-66.

**Ota T**, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie , Wakamatsu A, Hayashi K, Sato H, Nagai., Kimura K, Makita H, Sekine M,Obayashi M, Nishi T, Shibahara T, Tanaka T, Ishii S. (2004) Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nature Genetics*; 36(1):40-5.

**Parikh V**, Howe W.M, Welchko R.M, Naughton S.X, D'Amore D.E, Han D.H, Deo M, Turner D.L, Sarter M. (2013) Diminished trkA receptor signaling reveals cholinergic-attentional vulnerability of aging. *European Journal of Neuroscience*; 37(2):278-93.

**Pryor S**, McCaffrey G, Young L.R, Grimes M.L. (2012) NGF causes TrkA to Specifically Attract Microtubules to Lipid Rafts. *PLOS-ONE*; 7(4): e35163.

**Reichardt L.F.** (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*; 361(1473):1545-64.

**Sacristán M.P**, De Diego J.G, Bonilla M, Martín-Zanca D. (1999) Molecular cloning and characterization of the 5' region of the mouse trkA proto-oncogene. *Oncogene*. 18(42):5836-42.

**Schramm A**, Schulte J.H, Astrahantseff K, Apostolov O, Limpt V.v, Sieverts H, Kuhfittig-Kulle S, Pfeiffer P, Versteeg R, Eggert A. (2005) Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma. *Cancer Letters*; 228(1-2):143-53.

**Shatzky S**, Moses S, Levy J, Pinsk V, HersHKovitz E, Herzog L, Shorer Z, Luder A, Parvari R. (2000) Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) in Israeli-Bedouins:genetic heterogeneity, novel mutations in the TRKA/NGF receptor gene, clinical findings, and results of nerve conduction studies. *American Journal of Medical Genetics*; 92(5):353-60.

**Sofroniew M.V**, Howe C.L, Mobley W.C. (2001) Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annual Review of Neuroscience*; 24:1217-81.

**Suriu C**, Khayat M, Weiler M, Kfir N, Cohen C, Zinger A, Aslanidis C, Schmitz G, Falik-Zaccai T.C. (2009) Skoura--a genetic island for congenital insensitivity to pain and anhidrosis among Moroccan Jews, as determined by a novel mutation in the NTRK1 gene. *Clin.Genet.ClinicalGenetics*;75(3):230-6.

**Tacconelli A**, Farina A.R, Cappabianca L, Desantis G, Tessitore A, Vetusch A, Sferra R, Rucci N, Argenti B, Screpanti I, Gulino A, Mackay A.R. (2004) TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. *Cancer Cell*; 6(4):347-60.

**Wallach D**, Arumugam T.U, Boldin M.P, Cantarella G, Ganesh K.A, Goltsev Y, Goncharov T.M, Kovalenko A.V, Rajput A, Varfolomeev E.E, Zhang S.Q. (2002) How are the regulators regulated? The search for mechanisms that impose specificity on induction of cell death and NF-kappaB activation by members of the TNF/NGF receptor family. *Arthritis Research*; 4 Suppl 3:S189-96.

**Watson F.L**, Heerssen H.M, Bhattacharyya A, Klesse L, Lin M.Z, Segal R.A. (2001) Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nature neuroscience*; 4(10):981-8.

**Weier H.U**, Rhein A.P, Shadravan F, Collins C, Polikoff D. (1995) Rapid physical mapping of the human trk protooncogene (NTRK1) to human chromosome 1q21-q22 by P1 clone selection, fluorescence in situ hybridization (FISH), and computer-assisted microscopy. *Genomics*; 26(2):390-3.

**Wiesmann C**, Ultsch M.H, Bass S.H, de Vos A.M. (1999) Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature*; 401(6749):184-8.